

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“Inmunogenicidad De Albúmina De Ratón Con Epítpe De
Hemaglutinina De Influenza H3N2 En Ratón (*Mus
Musculus*)”**


TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIÓLOGO

Br. José Luis Roldán Chávez

PIURA-PERÚ
SETIEMBRE
2015

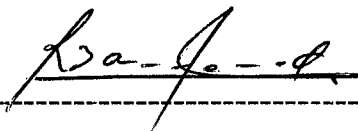
TÍTULO

“Inmunogenicidad de albúmina de ratón con epítoto de hemaglutinina de
influenza H3N2 en ratón (*Mus musculus*)”



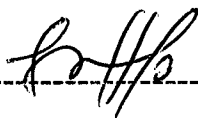
Dr. Torres Díaz Cesar Augusto

Presidente



Dr. Barrionuevo García Robert

Secretario

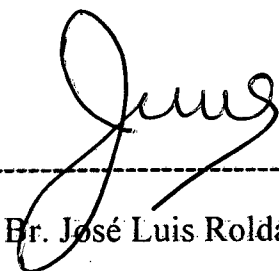


Mg. Bermejo Benites Jorge

Vocal

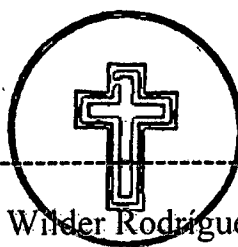
TÍTULO

“Inmunogenicidad de albúmina de ratón con epítoto de hemaglutinina de
influenza H3N2 en ratón (*Mus musculus*)”



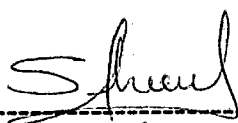
Br. José Luis Roldán Chávez

Ejecutor de Tesis



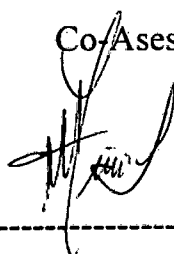
Blgo. Wilder Rodríguez Dr.

Asesor de Tesis



Dra. Patricia Sheen Cortavarria

Co-Asesora



Dr. Mirko Zimic Peralta

Co-Asesor

DEDICATORIA

Para mi familia la que siempre me ha brindado su apoyo en todas las aventuras académicas que he decidido emprender. En especial para mis padres José Roldan Llanos y mi madre Amely Chávez Zavala, quienes de manera apropiada y responsable me han sabido brindar los recursos necesarios para mi desarrollo tanto personal como académico, de esta manera permitir que yo como persona alcance, mi mejor “yo”, en base a esa confianza yo de manera responsable correspondo su sacrificio, esfuerzo y dedicación de la misma manera y en este caso con la realización de una investigación que me permite avanzar a un nivel profesional y a la vez personal por las experiencias vividas en la realización de esta.

AGRADECIMIENTOS

Agradesco a Dios, pues sin el nada es posible en esta vida, ya que es el quien nos da la vida y las oportunidades para poder demostrar lo grandes que somos.

Al Dr. Wilder Rodriguez por sus sabios consejos y asesorías en el desarrollo de mi tesis, al ser mi asesor.

A los Dr. Patricia Sheen Cortavarria y Dr. Mirko Zimic Peralta, quien me han permitido la realización de mi tesis en su prestigioso laboratorio y por su consejería en la realización de esta.

A Nadia Rodriguez quien muy amablemente dio su colaboración en parte importante de la realización de mi tesis.

A mi jurado de tesis, por la comprensión y asesoría en la realización de mi investigación.

RESUMEN

“Inmunogenicidad De Albúmina De Ratón Con Epítoto De Hemaglutinina De Influenza H3N2 En Ratón (*Mus Musculus*)”

Las vacunas han evolucionado desde el uso de bacterias y virus, tanto vivos como atenuados; con la comprensión específica de cómo es la generación de la respuesta inmune a los diversos patógenos; se desarrollaron las vacunas en base a subunidades proteicas y luego conjugados. En la actualidad con la vacunología inversa, se buscan los epítotoes (pequeñas secuencias inmunogénicas) de los antígenos de los patógenos que son capaces de activar una respuesta; por si solos estos no son capaces de una respuesta inmune alta, por lo que se usan adyuvantes y transportadores que suelen ser proteínas, para potenciarlos. La nueva propuesta es trasplantar un epítoto en una proteína de alto tiempo de vida media, como una proteína sérica (albúmina) y probar su capacidad de respuesta inmune contra el epítoto; la proteína debe ser del mismo organismo en donde se probara la vacuna por eso se eligió la albumina de ratón y se probó en estos animales.

Se produjo la proteína albúmina de ratón con el epítoto transplantado de influenza (ALB+Ep4) en *Escherichia coli*, con His-tag; se purifico por cromatografía de afinidad y replegó por diálisis; su buen replegamiento se comprobó por la prueba de captura de zinc por la proteína, esta fue evaluada por absorción atómica comparándola con la capacidad de captura de una albumina de ratón nativa de origen comercial; la proteína obtenida se cuantifico por el método de Bradford. La vacuna problema y las otras se elaboraron usando adyuvante Quill A completo y suero fisiológico; luego se inmunizo a los ratones. Grupos de 10 ratones por tipo de vacuna. El ensayo consto de tres tipos de vacunas: la vacuna problema (ALB+Ep4); como control albumina de ratón nativa comercial; y el epítoto solo (Ep4). Se medió la generación de anticuerpos usando una Elisa indirecta. El análisis de los

datos fue por la prueba de Kruskal-wallis y regresión lineal múltiple usando el programa estadístico Stata 12.

Se generó gran cantidad de proteína por el uso del sistema de *Escherichia coli*, y un replegamiento de 82%. Las mediciones de la respuesta inmune humoral (basada en anticuerpos IgG), de la vacuna ALB+Ep4, fueron mucho mayor que el resto de vacunas (Albumina de ratón nativa y Ep4). La respuesta específica contra el epítipo Ep4, por parte de la vacuna de ALB+Ep4 fue significativamente mayor a los generados por la vacuna Ep4. La vacuna en base a la Albumina de ratón nativa no generó anticuerpos contra esta misma ni contra Ep4.

Con lo obtenido se logró probar la hipótesis de que una proteína propia de un organismo con un epítipo transplantado es capaz de generar una respuesta inmune contra el epítipo que transporta, en el mismo organismo; así mismo recomendamos el no uso del segmento His-tag, pues afecta la inmunodominancia del epítipo y genera respuesta humoral no específica; a parte de la respuesta específica generada por el epítipo.

ABSTRACT

"Immunogenicity mouse albumin with influenza hemagglutinin epitope of H3N2 in mice
(*Mus musculus*)"

Vaccines have evolved from the use of bacteria and viruses, whether living or attenuated; It specifies the understanding of how the generation of the immune response to various pathogens; developed vaccines based on protein subunits and then conjugated. Currently with reverse vaccinology, epitopes (small immunogenic sequences) of the antigens of pathogens that are capable of activating a response is sought; by themselves they are not capable of high immune response, which are used adjuvants and carriers that are usually proteins, to strengthen them. The new proposal is to transplant an epitope on a high-protein half-life, as a serum protein (albumin) and test their ability immune response against the epitope; Protein should be the same body where the vaccine so the mouse albumin was chosen and tested in these animals was proven.

There was the protein albumin transplanted mouse with influenza epitope (ALB + Ep4) in *Escherichia coli*, with His-tag; I was purified by affinity chromatography and refolded by dialysis; its proper refolding was found by the test zinc capture protein, this was evaluated by atomic absorption capacity compared with the capture of a native mouse albumin commercial origin, the protein obtained was quantified by the Bradford method. The test vaccine and the other is prepared using adjuvant Quil A complete and saline; then immunized mice. Groups of 10 mice for type of vaccine. The test group contained three types of vaccines: the test vaccine (ALB + Ep4); as native albumin commercial control mouse; and the epitope alone (Ep4). It antibody generation was measured using an indirect ELISA. The data analysis was by Kruskal-Wallis test and multiple linear regression using Stata 12 statistical software.

Large amount of protein by using the system of Escherichia coli was generated, and refolding of 82% .The measurement of humoral immune response (IgG based antibodies), ALB + Ep4 the vaccine, were much higher than the rest of vaccines (Albumin native mouse and EP4).

The specific response against the epitope Ep4, by the ALB + Ep4 vaccine was significantly higher than those generated by the Ep4 vaccine. The vaccine based on native mouse albumin not generate antibodies against the same or Ep4.

Thus obtained was able to prove the hypothesis that protein itself a body with a transplanted epitope is capable of eliciting an immune response against the epitope carried on the same body; Also we recommend not using the His-tag segment, affecting the domination epitope and generates humoral response does not specify a specific, different from the specific response generated by the epitope.

INDICE GENERAL

| | |
|---|---------------|
| DEDICATORIA | - 4 - |
| AGRADECIMIENTOS | - 5 - |
| ÍNDICE DE TABLAS | - 12 - |
| ÍNDICE DE FIGURAS | - 13 - |
| INTRODUCCION | - 17 - |
| 1.1.VACUNAS | - 19 - |
| 1.1.1.1. TIPOS DE VACUNAS..... | - 19 - |
| 2.1.1.1.1. Vacunas inactivadas: virus y bacterias..... | - 19 - |
| 3.1.1.1.2. Vacunas recombinantes..... | - 19 - |
| 4.1.1.1.3. Vacunas de epítopes..... | - 20 - |
| 1.2.ADYUVANTES INMUNOLÓGICOS | - 21 - |
| 5.1.2.1. INMUNOLOGÍA DE LAS VACUNAS..... | - 23 - |
| 6.1.2.2. TRANSPORTADORES (CARRIERS)..... | - 24 - |
| 1.3.INFLUENZA A..... | - 27 - |
| 7.1.3.1. DESCRIPCION DEL VIRUS..... | - 27 - |
| 8.1.3.2. VACUNAS CONTRA INFLUENZA..... | - 28 - |
| 1.4.PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES | - 29 - |
| 1.5.ESTUDIO PRELIMINAR..... | - 32 - |
| FORMULACION DE OBJETIVOS..... | - 36 - |
| OBJETIVO PRINCIPAL:..... | - 36 - |
| OBJETIVOS ESPECIFICOS: | - 36 - |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | - 37 - |
| 2.1.UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO..... | - 37 - |
| 2.2.METODOLOGÍA | - 37 - |
| 9.2.2.1. Generación del gen de la albúmina de ratón con el epítipo de influenza H3N2 en el vector pet28a (pET28a: Alb: Ep4)..... | - 37 - |
| 10. 2.2.2. Expresión, purificación, concentración, cuantificación y replegamiento de la proteína albúmina de ratón con el epítipo de influenza H3N2 (Alb+Ep4)..... | - 38 - |

| | | |
|------------------------------|---|-------------|
| 11. 2.2.3. | Determinación de Zn ⁺² en Alb+Ep4 mediante absorción atómica (AA)..... | 39 - |
| 12. 2.2.4. | Inmunización de ratones..... | 42 - |
| 13. 2.2.4.1. | Inmunización con Alb+Ep4, albúmina nativa y epítoto..... | 42 - |
| 14. 2.2.4.2. | Determinación de anticuerpos mediante el inmunoensayo ELISA - 42 - | |
| 15. 2.2.5. | Análisis estadístico..... | 43 - |
| RESULTADOS | | 44 - |
| 3.1. | Verificación de la presencia del gen de albúmina pET28a: Alb: Ep4 | 44 - |
| 3.2. | Expresión de Alb+ep4 | 44 - |
| 3.3. | Purificación de proteínas: Alb+Ep4 | 49 - |
| 3.4. | Determinación de la concentración de proteína: Alb+Ep4 | 52 - |
| 3.5. | Replegamiento de proteína: Alb+Ep4 | 53 - |
| 3.6. | Prueba de comprobación de replegamiento de proteína | 53 - |
| 3.7. | Inmunogenicidad de los antígenos | 56 - |
| 16. 3.7.1. | Cinética de la generación de anticuerpos debido a Alb+Ep4.. | 56 - |
| 17. 3.7.2. | Cinética de la generación de anticuerpos debido a la albúmina nativa comercial de ratón..... | 57 - |
| 18. 3.7.3. | Cinética de vacuna en base al antígeno, Ep4..... | 57 - |
| 19. 3.7.4. | Comparación de la generación de anticuerpos específicos contra Ep4, entre la vacuna de Alb+Ep4 y E..... | 58 - |
| 20. 3.7.5. | Cinética de la presencia de anticuerpos reactivos contra albúmina de ratón..... | 60 - |
| 21. 3.7.6. | Cinética de la presencia de anticuerpos contra His-tag, por la vacuna Alb+Ep4..... | 61 - |
| DISCUSIÓN | | 62 - |
| CONCLUSIÓN..... | | 71 - |
| RECOMENDACIONES | | 72 - |
| BIBLIOGRAFICA | | 73 - |
| ANEXOS | | 90 - |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----------------|
| Tabla 1: Regiones de orientación similar a los epítopes de hemaglutinina de la influenza A en la albúmina de ratón..... | Pag. 34 |
| Tabla 2: Resumen de los resultados de expresión de la proteína Alb+Ep4..... | Pag.44 |
| Tabla 3: Curva de calibración de zinc..... | Pag.54 |
| Tabla 4: Prueba de retención de zinc por el sistema de ultrafiltración Amicon..... | Pag. 54 |
| Tabla 5: Cálculo de la eficiencia del replegamiento de la Alb+Ep4 y la albúmina nativa comercial..... | Pag.55 |
| Tabla 6: Calculo de las constantes de afinidad K_a , para Albúmina nativa de ratón y la Alb+Ep4..... | Pag.55 |
| Tabla ANEXO 1: Búfer de purificación..... | Pag.94 |
| Tabla ANEXO 2: Búfer para la purificación de una proteína soluble..... | Pag.95 |
| Tabla ANEXO 3: Búfer para la purificación, para una proteína no soluble..... | Pag.96 |
| Tabla ANEXO 4: Preparación de estándar de BSA..... | Pag.98 |
| Tabla ANEXO 5: Preparación de muestras de proteína..... | Pag.99 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|---------------|
| Figura 1: Esquema general de como función los adyuvantes..... | Pag.22 |
| Figura 2: Mecanismos de activación de las células B, por las células T Helper. Tomado de Abbas, A.K. and Lichtman, A.H. (2005) Cellullar and Molecular Immunology..... | Pag.24 |
| Figura 3: A) estructura de los dominios de la albúmina humana, dominio I (guinda), dominio II (azul), dominio III (verde). B). Sitio de unión a zinc propuesto, conformado por residuos de dominio I (guinda) y dominio II (azul). Tomado de (Blindauer C.A. et al; 2009)..... | Pag.26 |
| Figura 4: Diagrama esquemático de la estructura del virus influenza A (Naru Zhang, et al; 2014)..... | Pag.27 |
| Figura 5: Cuerpos de inclusión en <i>Escherichia coli</i> . Foto tomada de (Gergiou G; 1999)..... | Pag.30 |
| Figura 6: Vista general esquemática de los temas tratados en la revisión, destacando los parámetros (derecha) que afectan en gran medida el éxito de la expresión soluble (Francis D.M, Page R., 2010)..... | Pag.31 |
| Figura 7: Modelo teórico de H3N2 influenza hemaglutinina A/Wuhan/359/95. | Pag.32 |
| Figura 8: Modelo teórico de la albúmina de ratón. Muestra los dominios estructurales de proteínas globulares compuestas por única hélice alfa y bucles..... | Pag.34 |
| Figura 9: Epitope 1, trasplantado a la superficie de la albúmina de ratón..... | Pag.35 |
| Figura 10: proceso de evaluación de captura de zinc por la albúmina. [Zn] o, [Zn] F y [Zn] como, corresponde a concentración de zinc inicial, final y atrapado en la membrana respectivamente..... | Pag.40 |
| Figura 11: Verificación de la presencia del gen de albúmina gen de albúmina pET28a: Alb: Ep4. En gel de electroforesis al 1% de agarosa. Número de bases de pET-28 ^a , 5369 bp, y de gen de la albúmina con ep4, 1752 bp..... | Pag.44 |

- Figura 12:** SDS-PAGE de la expresión de Alb+ep4 inducido a 23°C por 4 h y concentración de IPTG de 0.5 mM. La flecha indica la banda de expresión de alb+ep4 de 67KDa.....Pag.45
- Figura 13:** SDS-PAGE de la expresión de Alb+ep4 inducido a 23°C por 6 h y concentración de IPTG de 0.5 mM. La flecha indica la banda de expresión de alb+ep4 de 67Kda.....Pag.45
- Figura 14:** SDS-PAGE de la expresión de Alb+ep4 inducido a 23°C por 4 h y concentración de IPTG de 0.5 mM. La flecha indica la banda de expresión de alb+ep4 de 67KDa.....Pag.46
- Figura 15:** SDS-PAGE de la expresión de Alb+ep4 inducido a 23°C por 4 h y concentración de IPTG de 0.5 mM. La flecha indica la banda de expresión de alb+ep4 de 67Kda.....Pag.46
- Figura 16:** SDS-PAGE de la expresión de Alb+ep4 inducido a 23°C por 4 h y concentración de IPTG de 0.5 mM. La flecha indica la banda de expresión de alb+ep4 de 67Kda.....Pag.46
- Figura 17:** Electroforesis de gel SDS-PAGE al 12%, muestras de Albúmina con epítipo transplantado (Alb+EP), a diferentes condiciones: temperatura de inducción de 30°C; tiempo de inducción de 4 h y concentración del inductor IPTG de 1 mM. La flecha indica la banda de expresión de albúmina de ratón de 67KD.....Pag.47
- Figura 18:** Electroforesis de gel SDS-PAGE al 12%, muestras de E. coli BL21pLysisS con plásmido pET28a sin inserto, a la condición de una temperatura de inducción a 37° C, con tiempos de inducción de 4 y 6 h y una concentración de inductor (IPTG) de 1mM.....Pag.47
- Figura 19:** Electroforesis de gel SDS-PAGE al 12%, de la proteína Alb+Ep4, donde se observa el cultivo sin inductor (NI) y el cultivo con inductor (I). La flecha indica la banda de expresión de la proteína de peso de 67KDa.....Pag.48

| | |
|---|---------------|
| Figura 20: Electroforesis de gel SDS-PAGE al 12%, de la proteína Alb+Ep4, donde se observa el extracto crudo (1), la fracción soluble (A) y la fracción insoluble (B).La flecha indica la banda de expresión de albúmina de ratón de 67KDa..... | Pag.48 |
| Figura 21: Electroforesis de gel SDS-PAGE al 12%, de las fracciones colectadas de la purificación por cromatografía de afinidad usando la columna His-Trap de 5 ml. Las flechas indica el peso de la albúmina transplantada de 67KDa. El marcador de proteínas usado es Broad Range..... | Pag.50 |
| Figura 22: Cromatografía de la purificación de la albúmina de ratón con el epítipo transplantado..... | Pag.51 |
| Figura 23: Análisis de Bradford para la cuantificación de proteínas y la curva estándar..... | Pag.52 |
| Figura 24: Electroforesis SDS-PAGE al 12%. Muestra de Albúmina de ratón recombinante replegada, y el marcador de proteínas SDS-BROAD RANGE..... | Pag.53 |
| Figura 25: El box plot del análisis de los datos, donde se observa absorbancias en los diferentes tiempos..... | Pag.56 |
| Figura 26: El box plot del análisis de los datos, donde se observa absorbancias en los diferentes tiempos..... | Pag.57 |
| Figura 27: El box plot del análisis de los datos, donde se observa absorbancias en los diferentes tiempos..... | Pag.58 |
| Figura 28: Resultado, arrojado por el programa stata12, y los valores de los p, para cada variable, siendo estos valores significativos para todas las variables..... | Pag.59 |
| Figura 29: Box plot de los resultados de la regresión lineal múltiple de las dos vacunas en los diferente tiempos. Vacuna 1 (Alb+Ep4), vacuna 2 (Ep4)..... | Pag.59 |
| Figura 30: El box plot del análisis de los datos, donde se observa absorbancias en los diferentes tiempos..... | Pag.60 |

Figura 31: El box plot del análisis de los datos, donde se observa absorbancias en los diferentes tiempos.....Pag.61

Figura 32: Activacion de distintos linfocitos B por un mismo epitope.....Pag.69

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de la cura y prevención de las enfermedades a guiado a los científicos a generar a las vacunas, definidas como cualquier preparación de una sustancia capaz de generar inmunidad contra una enfermedad (OMS, 2015). Las vacunas adquieren importancia relevante al lograr combatir enfermedades exitosamente demostrando así su valor al salvar vidas, prevenir epidemias y erradicar enfermedades (Greenwood, et al; 2011; Thomas S. and Luxon B; 2013). A pesar que las vacunas son elaboradas de diversas maneras, es importante conocer sus ventajas y desventajas, para optimizar la manera más adecuada de conseguir una protección contra la variedad de patógenos existentes. (Thomas S, Luxon BA, 2013).

La capacidad de generar memoria inmunitaria contra un patógeno es la base del desarrollo de las vacunas. Las primeras vacunas se elaboraron con patógenos vivos (viruela, sarampión, rubeola, papera); inactivadas (influenza, poliomielitis, tuberculosis) y subunidades proteicas (virus de Hepatitis B), conjugados (meningitis, influenza y neumonía bacteriana) (McHugh K, et al, 2015) (Bazin H., 2008) (Plotkin S.; 2012). A la vez que empezaba el desarrollo de las vacunas se observaron sus limitaciones como la necesidad de sustancias que incrementen la respuesta del sistema inmune a la vacuna (adyuvantes) (Coffman R, et al; 2010) y la reactivación de organismos atenuados. Con el desarrollo del ADN recombinante, se elaboró una nueva línea de vacunas en base a subunidades proteicas producidas en otros organismos (hepatitis B) (Tron F., 1994). Luego se elaboraron vacunas conjugadas con polisacáridos con gran éxito para enfermedades que activan linfocitos B sin necesidad de linfocito T, y para lo cual las células presentadoras de antígenos (APC) no logran procesar los péptidos inmunogénicos (*Haemophilus influenzae* tipo b) (Goldblatt D, 2000)

El desarrollo de la “vacunología inversa” junto con las herramientas bioinformáticas dieron un giro al desarrollo de las vacunas; usando la secuencia genética de los patógenos se predijo antígenos inmunogénicos (Rappouli, 2000)(Giuliani et al, 2006) y epítopes para MHC-I y MHC-II, moléculas de presentación de antígenos que se unen a epítopes

inmunogénicos (Moutaftsi et al, 2006)(Lundergaard C. et al, 2006)(Peters et al; 2006) (Wang et al; 2008).

La nueva línea de vacunas promete la solución a los problemas de alto costo, seguridad, reactogenicidad con antígenos propios, alergias, potenciación de elementos estructurales de baja inmunogénicos y capacidad de conjugar péptidos a diferentes antígenos como soportes (Moisa A, Kolesanova E; 2010) (Sesardic D, 1993). La vacuna en base al epítotope ELDKWA tetramero unido a BSA contra el HIV generó alta producción de anticuerpos neutralizantes (Xiao et al, 2000). La vacuna para hepatocarcinoma basada en el epítotope de alfa-fetoproteína c unido la proteína HSP72 generó buena respuesta celular y humoral en los ratones (Li et al, 2015). Sin embargo, trae desafíos: los epítotospes presentan baja eficiencia en la generación de una respuesta humoral y celular y problemas en su predicción.

En este estudio se evaluó la hipótesis de usar una proteína propia del hospedero con vida media larga conteniendo en su estructura un epítotope de una proteína de un agente infeccioso (epítotope transplantado). La proteína funcionaría como un transportador generando micro-inmunizaciones del epítotope transplantado. El epítotope inmunogénico usado fue el de hemaglutinina de influenza A H3N2 (KAYSNCYPYDVDPY) denominado epítotope 4 (Ep4) (Yun Lu et al, 2002 y Hua Li et al, 2003). El gen del Ep4 fue transplantado en el gen de albúmina de ratón (Alb). La Alb+Ep4 recombinante obtenida en *E. coli* fue usado para inmunizar ratones. Asimismo, se incluyó como controles Ep4 y Alb por separado. La Alb+Ep4 generó mayor cantidad de anticuerpos con respecto a Ep4 y Alb, confirmando la posibilidad de esta nueva propuesta de vacuna para epítotospes.

1.1. VACUNAS

1.1.1. TIPOS DE VACUNAS

1.1.1.1. Vacunas inactivadas: virus y bacterias

Existen muchas formas de vacunas en la actualidad, pero en el inicio se usaron a los mismos organismos infecciosos atenuados como vacunas y se han usado por más de un siglo permitiendo la erradicación de muchas enfermedades infecciosas. Las primeras vacunas fueron: vacuna de la viruela, a través de una leve infección con el virus de viruela de la vaca. (Greenwood, et al; 2011), la vacuna de virus de polio atenuado en 1880, (Bazin H., 2008), la vacuna del bacilo atenuado de *Mycobacterium bovis* (Calmette-Guerin, BCG) en 1927 (Plotkin S.; 2012), todas muy exitosas.

1.1.1.2. Vacunas recombinantes

Las vacunas recombinantes consisten de antígenos inmunogénicos obtenidas mediante el uso de DNA recombinante. Entre las vacunas recombinantes existen muchos tipos; como las vacunas de subunidades de hepatitis B (McAleer et al., 1984) y de la enterotoxina B recombinante producida en *E. coli* (Coffman J., 2002); otras fusionan subunidades de diferentes proteínas en una proteína quimérica, expresándolas en bacterias, levaduras o células de mamífero, un ejemplo es la vacuna de influenza basada en hemaglutinina. (Shaosheng C. et al, 2014), así como la vacuna BCG-EgG1Y162 producida contra la infección por *Echinococcus granulosus*. (Xiumin Ma. Et al, 2015).

Otro tipo de vacuna recombinante que está muy difundido su uso son los virus-like particles (VLP) que consisten en la formación de la capsida viral, pero sin material genético. (Smith et al, 2015). Un ejemplo es la vacuna contra diversos tipos de influenza basada en la proteína hemaglutinina. (Shaoheng Chen et al, 2015) también otro ejemplo es la vacuna cuadrivalente contra el virus de papiloma humano (HPV-6,-11,-16 y -18) de Merck (Goldstone and Vuocolo; 2012).

Así mismo concordante con el avance de la vacunología inversa, se empezaron a producir las vacunas en base a epítopes y multiepitópica, las cuales son producidas en bacterias y levaduras. Un ejemplo de ello es la vacuna multiepitópica para el virus de Epstein-Barr, en el que además se usan vacuna de ADN, logrando buenos resultados. (Chen et al, 2013).

1.1.1.3. Vacunas de epítopes

Las vacunas de epítopes se basan en el uso de epítopes inmunogénicos para generar una respuesta inmune, sea humoral o celular. La predicción de epítopes mediante métodos bioinformáticas permite la elaboración de vacunas para los diferentes patógenos. (Kum Yu et al, 2002).

Los epítopes se clasifican de acuerdo al complejo de histocompatibilidad que los presenta, puede ser el complejo de histocompatibilidad I (MHCI) o el (MHCII). Cada tipo de epítope presentado tiene una respuesta típica, los presentados por MHC I, generan una respuesta celular, activación de linfocitos citotóxicos, y los presentados por MHC II, una respuesta humoral, basada en anticuerpos (inmunoglobulinas) por activación de los linfocitos B, con ayuda de los linfocitos t Helper. (Purcell et al; 2007). Usando la vacunología inversa, que une la inmunología y la bioinformática, (Rappuoli, 2000), se crearon predictores de epítopes para los complejos de histocompatibilidad; al inicio no predecían a los epítopes inmunogénicos con exactitud, dando falsos positivos, pero luego evolucionaron hasta llegar a hacer muy seguros en la predicción, siendo además comprobados experimentalmente (Lundegaard et al, 2006)(Wang et al, 2008)(Hong Huang et al, 2008).

Las primeras vacunas basadas en epítopes estuvieron conjugadas con proteínas, o mezcladas con adyuvantes o usando transportadores para lograr respuesta inmune alta, como las vacunas basadas en epítopes contra diferentes cánceres que funcionan con ciertas limitaciones. (Cherryholmes et al, 2015). (Pol et al, 2015). Las vacunas multiepitópicas que son la unión de varios epítopes unidos, y con la tecnología del ADN recombinante fueron diseñadas para expresarse como proteínas sintéticas en bacterias, levaduras y células de mamíferos, facilitando así su obtención. Así tenemos varios ejemplos como la vacuna contra la *H. pylori*, basado en epítopes de las subunidades úreasa A y B y como

adyuvante la toxina b del cólera, obteniendo anticuerpos neutralizantes en ratones. (Guo L. et al, 2013).

1.2. ADYUVANTES INMUNOLÓGICOS

El significado de adyuvante es de ayudar, por ende la definición de adyuvante inmunológico, es cualquier sustancia que tenga la capacidad de acelerar, prolongar y mejorar la respuesta inmune de las vacunas. (Vogel R.F, 1995).

Los adyuvantes se clasifican de acuerdo a su naturaleza química, propiedades físico-químicas, origen, y propiedades inumoduladoras. Los adyuvantes además deben poseer ciertas propiedades como no ser tóxicas, estimular la respuesta humoral y celular, dejar memoria a largo tiempo, no causar autoinmunidad, no ser mutagénica, no ser cancerígena, pirogénica y ser estable en diversos rangos de tiempos, temperaturas y pH (Marciani D., 2003).

La forma de actuar de los adyuvantes en general es mediante la asociación a receptores como los TLRs a través de la formación de una emulsión, donde antígeno y adyuvante son secuestrados en el lugar de la aplicación y luego soltados lentamente para ir estimulando a las células presentadoras de antígenos (Aderem, A. and Ulevitch, J.; 2000) (Satthaporn, S. and Eremin, O.; 2001). Otros adyuvantes se unen a receptores específicos en las células presentadoras de antígenos, otros poseen residuos de manosas que se unen a receptores específicos para estos e inician la endocitosis para el procesamiento de antígenos. (Stahl, P.D. and Ezekowitz, R.A.; 1998). Al final el objetivo del adyuvante es potenciar la respuesta inmunogénica, al unirse a los TLRs activan la cascada de señalización de tirosinas que termina con la producción de citoquinas pro inflamatorias y esto lleva también a la activación de la maquinaria de presentación de antígenos mediante la sobreexpresión de moléculas como MHC I y II (complejo de histocompatibilidad) y moléculas de adhesión. (Marciani, 2003).

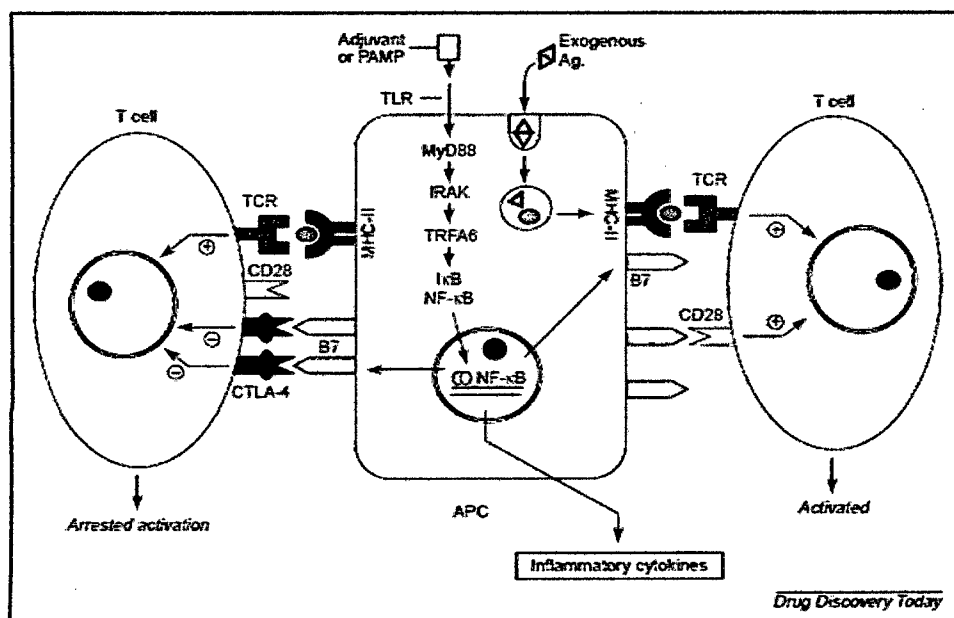


Figura N°1: Esquema general de como función los adyuvantes. Sacado de Marciani, 2003. *Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in Vaccines immunogenicity.*

Las saponinas, un tipo de adyuvante, estimula una respuesta inmune dependiente de activación T-dependiente, TH1 o TH2 (Press, J.B. et al; 2000). Las saponinas son un conjunto de esteroides y glucósidos triterpénicos aislados a partir de una amplia gama de plantas (Ej: QuilA) (Remington J.P. and Woods H.C; 1918) (Ronnberg B. et al ; 1997) (Morein B. et al; 1984)(Sun H.X. ; 2005), reconocidas por su capacidad potente como adyuvante (Skene, 2006), pero su uso ha sido limitado debido a su toxicidad, actividad hemolítica y la inducción de reacción en el sitio de aplicación (Waite D.C.; 2001). Las saponinas han sido usadas en las últimas tres décadas como adyuvante en las vacunas veterinarias, por su capacidad de producir respuesta inmunes en base a inmunoglobulinas IgG1,3,2^a y 2b.. (Kensil C.R; 1996).(Xiao et al, 2007).

El adyuvante Quil A es una mezcla de saponinas, 21 tipos, las cuales tienen diversos efectos cuando se usan como adyuvante. Su forma de actuar es por endocitosis, mediante receptores, lo que permite que el antígeno entre dentro de las células presentadoras o macrófagos y pase por la vía del endosoma y genere activación de células CD8, también por la inducción de citoquinas tal vez por la unión a PRR en las células.(Rajput Z et al; 2006) (Cox J and Coulter A., 1997).

1.2.1. INMUNOLOGÍA DE LAS VACUNAS

El inicio de la respuesta inmune, se da cuando un patógeno invade un tejido y lo infecta, la primera línea de defensa es la respuesta inmune innata, a la cual le precede la respuesta inmune adaptativa, una respuesta selectiva y específica. Las principales células en las respuestas inmunes, son las células dendríticas (DC) o células presentadoras de antígenos, estas células se encargan de capturar los antígenos (bacterias, virus, entre otros) mediada por receptores TLRs (Cavanagh and Von Andrian; 2002)(Iwasaki and Medzhitov, 2004). Influenciado por citoquinas, las DC con el antígeno procesado migran a la zona T de los nódulos linfáticos, lo presentan a las células T vírgenes, o linfocitos T. El fenotipo de las DC cambia de fagocitador, a presentador (Cavanagh and Von Andrian; 2002) (Miller et al, 2003) (Ver figura 8). Las DC presentan el antígeno a través del complejo de histocompatibilidad tipo I o II (MHC), el cual lleva un péptido que interactúa con el receptor del linfocito T (TCR). Los linfocitos T (CD4+) activan a los linfocitos B a través del MHC II (Inaba and Steinman, 1984).

La interacción transitoria entre la DC y el linfocito T (CD4+) estimula la producción de IL-2. (Matloubian et al, 2004). CD28 se une a B7 de la DC, para afirmar la interacción de la activación de los linfocitos T (CD4+). (Schweitzer and Sharpe; 1998); mientras que CTL-4, que es muy afín a B7, y es capaz de inactivar dicha interacción (Bluestone; 1995). Finalmente las moléculas de adhesión LFA-1 con ICAM-1; CD2 con LFA-3 o CD59; respectivamente linfocitos T y DC. (Shaw and Dustin, 1997).

El tipo de respuesta inmune adaptativa se genera de acuerdo al patógeno invasor, si es bacteria o virus, se tendrá una respuesta TH1, con citoquinas como IL-2, interferón gama (IFN); si el invasor es un helminto, se tendrá una respuesta TH2, con citoquinas como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Pulendram; 2004).

Las células B o linfocitos B, pueden activarse, mediante los linfocitos T o no, dando de esta manera linfocitos B, T dependientes y linfocitos B, T independientes (Martin and Kearny; 2002). La activación de los linfocitos B dependientes de activación por linfocito T permite a los linfocitos B diferenciarse en los centros germinales de los nódulos linfáticos, mejorando la afinidad de los anticuerpos. Si los linfocitos B no reciben la ayuda de los linfocitos T, estos sufren apoptosis en la zona T (Goodnow; 2005). La interacción entre los

linfocitos T (CD4+) y los linfocitos B, necesita del crucial reconocimiento del péptido en el MHC II, en el linfocito B, por parte del TCR del linfocito T, además de moléculas como CD40 y cd40 ligando, respectivamente. Como de moléculas de adhesión como LFA-1 con ICAM-1. (Bluestone; 1995) (Figura No 2).

Los centros germinales de linfocitos B, proliferan masivamente, dando lugar a los centroblastos, o zona oscura (MacLennan; 1994). Estos son capaces de regular la expresión de inmunoglobulinas (IG) y en la proliferación los genes de IG, adquieren mutaciones puntuales somáticas (Bereck et al; 1991). Los centrositos o zonas claras es la siguiente etapa, en donde los linfocitos B incrementan la afinidad de sus anticuerpos contra el antígeno, y son seleccionados para sobrevivir y diferenciarse. Los linfocitos B que salen del centro germinal son de vida larga a comparación de los que no pasan por el centro germinal. (Slifka et al; 1998).

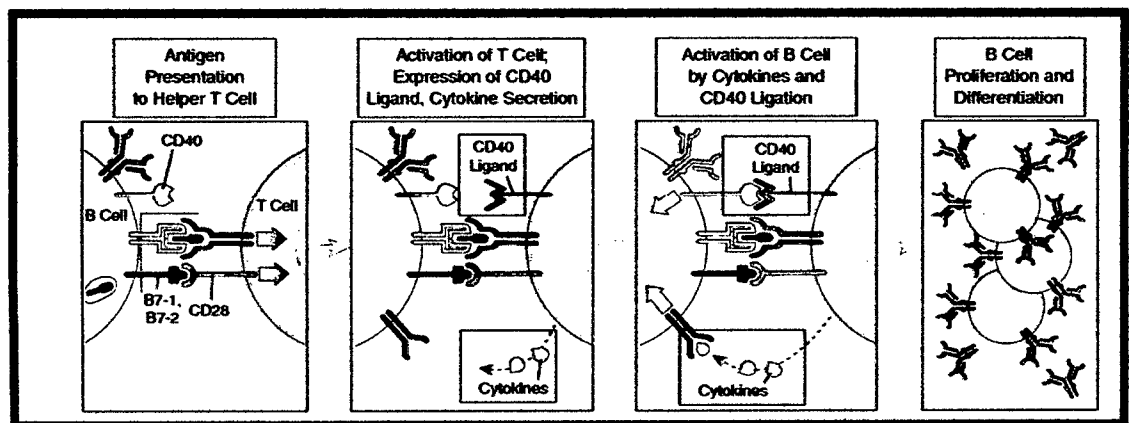


Figura N° 2: Mecanismos de activación de las células B, por las células T Helper. Reproducido de Abbas, A.K. and Lichtman, A.H.(2005) *Cellular and Molecular Immunology*, 5th ed.Elsevier Saunders.

1.2.2. TRANSPORTADORES (CARRIERS)

En las vacunas, un transportador o más conocido como “carrier” en inglés tiene la función de mejorar la respuesta inmune, mediante la entrega a las células encargadas de la respuesta inmunogénica. Paralelo al desarrollo de las vacunas, también hubo avances en su entrega al sistema inmune. Actualmente existen muchas formas de entrega como son los liposomas, micropartículas (MP), nanopartículas (NPs), y

transportadores como los virosomas, partículas virales unidas (VLP), conjugados químicos y complejos inmuno-estimulantes (ISCOMS). (Garg et al, 2014).

➤ **Albúmina sérica**

La albúmina es una proteína abundante en el plasma con la capacidad de unión a otras moléculas, sirve como transportador de fármacos (Mao H, et al; 2000). En las vacunas; la albúmina tiene la finalidad de transportar antígenos y estimular la respuesta inmune humoral o celular. La albúmina más usada ha sido la albúmina de suero bovino (BSA) la cual ha sido conjugada químicamente, como en la vacuna contra la nicotina del tabaco (Yun Hu et al, 2014), vacuna contra la heroína en la que se usa BSA unido a Morhap (Torres et al, 2014), en glycoconjugado como en la propuesta de vacuna lactose-BSA (Jahouh et al, 2012) o epítopes mezclados con proteínas (BSA). (Yun Lu et al, 2002) . También se usa la albúmina (BSA) para probar modelos para las vacunas, como en el uso de materiales absorbentes como “3D ordered macroporous carbón” en la prueba de vacunas orales que usan el BSA como material de transporte (Zhao Q. et al; 2015) (Zhang Q. et al, 2014) o unido a micropartículas HES (Balasse et al, 2007) y en nanocarries (Kunda et al, 2014).

Otras características de la albúmina son: Transportador de nutrientes y metabolitos (Fasano et al; 2005); compuesto de un único polipéptido de 585 aminoácidos con 17 puentes disulfuro formando 3 dominios helicoidales (I, II y III) cada uno de los cuales contiene dos subdominios (Foster, J; 1977).

Las albúminas de los mamíferos poseen cuatro sitios de unión a metales, estos son el sitio N-terminal (NTS, o ATCUN); el sitio del residuo de cisteína 34, el sitio A o sitio de unión multi-metal (MBS) y el sitio B. (Jin Lu. et al, 2008) a la vez tiene la función fisiología de regular el transporte de metales como el zinc, el cobre, el níquel y cadmio. (Bal W. et al, 2013) en los diversos estudios de unión de estos metales a la albúmina de mamíferos, se determinó un sitio de alta afinidad para el metal zinc (Martins and Drakenberg, 1982) (Masuoka and Saltman, 1994) (Bal et al, 1997) (Fanali, et al, 2012) y las técnicas más usadas son dicroísmo circular, espectroscopia de resonancia de spin electrónico (Bal et al, 1997), NMR (Goumakos, 1991) así mismo en el análisis de datos se usan ecuaciones en base a la constante de afinidad (K_a) (Bal

et al , 1998) como la constante de disociación (K_d) , y adaptaciones de estas según los experimentos.(Ohyoshi E, et al;1999) (Andre C and Y.C Guillaume, 2003). El sitio de unión de la albúmina con el ion metálico Zinc (II) se encuentra ubicado en la interface de los dominios I y II , cada dominio proporciona dos ligandos His67, Asn99 del dominio I, y para el dominio II, son His247 y Asp 249 (Sugio et al ; 1999) (Jin Lu et al; 2008). (Figura No 3).

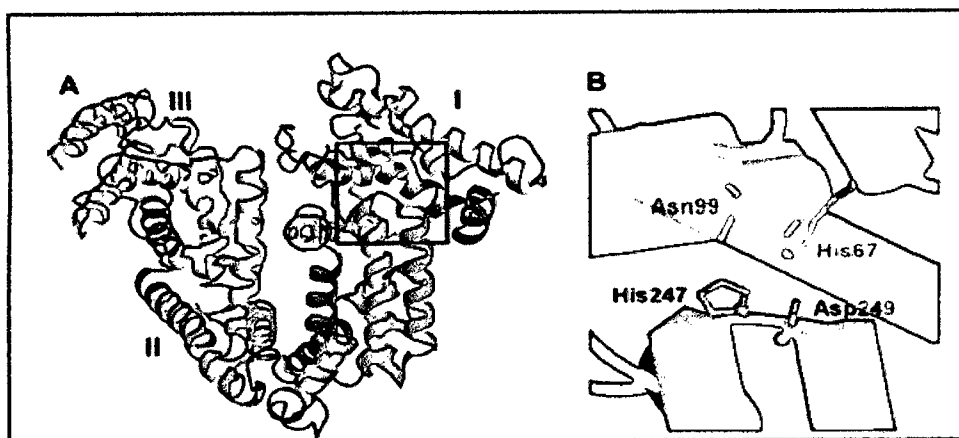


Figura N° 3: A) estructura de los dominios de la albúmina humana, dominio I (guinda), dominio II (azul), dominio III (verde). B). Sitio de unión a zinc propuesto, conformado por residuos de dominio I (guinda) y dominio II (azul). Tomado de (Blindauer C.A. et al; 2009)

El acercamiento de las dos histidinas, permite la unión con el zinc (Stewart A.J.; 2003), en forma geométrica pentacoordinada con el Zn^{+2} (Bal et al; 1998). En la posición apical se une a una molécula de agua o un anión como por ejemplo (Cl^-). Con una distancia promedio zinc- o/N de $1.98^{\circ}A$ y con un sexto débil vínculo O/N de distancia de $2.48^{\circ}A$. Los residuos son conservados en todas las secuencias de las albúminas de mamíferos (Blindauer C.A. et al; 2009). La estructura tridimensional de HSA demostró que poseía dos sitios de unión localizados en cavidades hidrofóbicas en los subdominios II A y III A. (André C.; 2003) (Peyrin E.; 1997).

Se aprecia que la unión de ácidos grasos a la HSA afecta de manera directa la interacción del Zn^{+2} con la HSA, tanto en el sitio A como en el sitio B, y que el sitio B es probable para la unión de un segundo ion de Zn^{+2} es el sitio B para Cd (Lu J. et al; 2012). Al unirse una molécula de ácido graso en el sitio FA2, realiza un movimiento

considerable del dominio-dominio necesario para el alojamiento del Zn^{+2} . Y ciertos ácidos grasos como el miristato de relevante longitud de cadena disminuyen sustancialmente la capacidad de la albúmina de unir Zn^{+2} (Blindauer A.C; 2013).

1.3. INFLUENZA A

1.3.1. DESCRIPCION DEL VIRUS

El virus de influenza causante de enfermedad ha estado circulando desde 1971, y las variedades son influenza A, H1N1 Y H3N2 e influenza B (Prevention and Control of Influenza with Vaccines; 2010). El virus de la influenza A, pertenece a la familia Orthomyxoviridae, posee un genoma que codifica varias proteínas virales, las cuales son hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), proteínas de membrana (M), nucleoproteínas (NP) y proteínas estructurales. Dentro de la envoltura viral se encuentra la ribonucleoproteína (RNP) que consiste en segmentos de ARN asociados con NP y PA, PB1, PB2 y proteínas de la polimerasa. (G. Neumann et al; 2009). (Figura No 4).

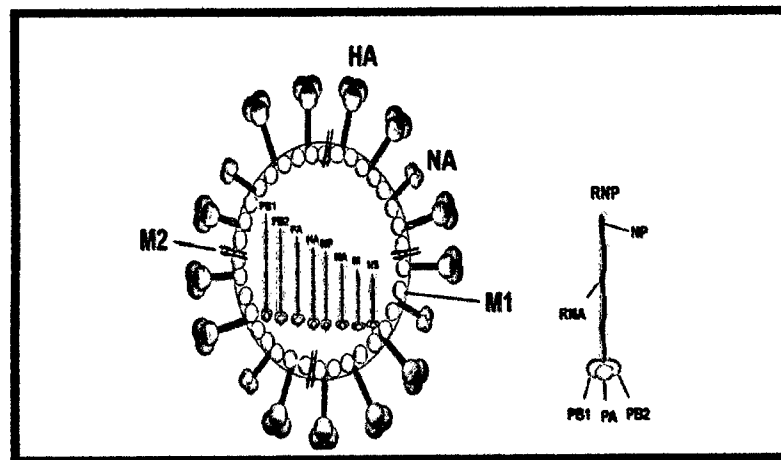


Figura N° 4: Diagrama esquemático de la estructura del virus influenza A (Naru Zhang, et al; 2014).

Dentro de las proteínas que forman el virus, la HA, NA y M, son las proteínas de mayor antigenicidad, siendo la HA, la más antigénica y estando en una proporción de un 80% en forma de un trímero, le sigue la NA en un 17 % y la M en especial la M2 en un menor porcentaje. (Nayak et al; 2009). La hemaglutinina es una proteína homotrimerica unida por puentes disulfuro, la parte globular está compuesta por HA1 y el tallo por HA1 Y HA2. (Wilson et al, 1981). Y una de las más importantes para la elaboración de las vacunas, pues la variación de la proteína HA, así como NA definen los subtipos de influenza, y es una de las limitantes en la elaboración de vacunas, la alta mutabilidad de estas proteínas (Kang et al, 2011); por eso se buscan enfoques de protección cruzada para varios subtipos, y se ha visto que se pueden generar reacción cruzada de manera que los anticuerpos generados por un subtipo son capaces de reconocer otros subtipos, esto es debido a la conservación de ciertas regiones que generan epítopes conservados. (Mancini et al, 2011).

1.3.2. VACUNAS CONTRA INFLUENZA

Las vacunas basadas en cepas de virus inactivados, han sido eficaces en controlar los brotes de influenza estacional (Osterholm MT; 2012). Salk et al, 1945 prueba la primera vacuna inactivada en prueba clínica, contra influenza A y B con buenos resultados.

Las vacunas ahora contra la influenza son vacunas trivalentes de virus atenuados, las cuales necesitan una gran capacidad y establecimientos especializados, por la necesidad de huevos para su producción (Hoa LK; 2011). De manera de mejorar las vacunas de virus atenuados, se propuso un reordenamiento del genoma; el cual llevan genes de enfermedades infecciosas, un ejemplo de ello es un tipo de prototipo de vacuna usando el virus de la gripe H9N2, la cual mostró excelentes resultados. (Lindomar Pena, et al ; 2013).

Se ha encontrado que la hemaglutinina y la neuraminidasa son antígenos importantes ya que generan un fuerte respuesta inmune impulsando a la generación de epítopes (Fiers W; 2004). Usando un péptido por duplicado y conservado de hemaglutinina no relevantemente inmunogénico se generó una gran respuesta humoral contra éste al unirlo a una albúmina sérica bovina (Lu Y, et al, 2002). Las vacunas

contra influenza en base múltiples epítopes de regiones conservadas tienen la capacidad de generar una protección cruzada al proteger contra varios tipos de influenza. (Du Lanying, Zhou Yusen, Jiang Shibo; 2010). Un ejemplo de una vacuna multiepitópica es la vacuna contra la influenza H5N1, la cual posee seis epítopes universales conservados para hemaglutinina, proteína nuclear, y proteína de membrana 1, las cuales generan respuesta humoral y celular (Y. Adar et al, 2009). Vacunas elaboradas en base a péptidos de influenza son capaces de proteger contra muchos tipos de influenza, incluyendo H3N2, H1N1 y H5N1 (Wang T; 2015).

1.4. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para la expresión de proteínas en otros sistemas se usan levaduras, células de mamíferos, células de insecto, y bacterias, entre las bacterias la cepa de *E. coli* más usada y de mejor resultados es la de tipo BL21(DE3) (Chart; 2000) son fáciles de manipular y de bajo costo (Khow O., Suntrarachun S., 2011); en este sistema la ARN polimerasa de T7 transcribe el ADN más rápido que la ARN polimerasa de la bacteria; el promotor T7 funciona bajo el control del promotor LacUV5 el cual necesita del inductor IPTG para activarse. La T7 ARN polimerasa transcribe el gen unido al promotor T7 el cual está listo para ser traducido (Studier et al; 1986). Sin embargo, altos niveles de expresión de proteínas recombinantes a menudo resulta en su acumulación como agregados insolubles o cuerpos de inclusión (Kane and Hartley; 1988) (Fahnert, et al; 2004), así como proteínas mal plegadas, especialmente si se expresan proteínas heterólogas debido a la incapacidad de *E. coli* de realizar modificación post-tradicionales y al sobrepaso de la capacidad de replegar una gran cantidad de proteínas (Francis D.M, Page R., 2010). (Figura No 5). (Hunke S., Belton J-M; 2003).



Figura N° 5: *Cuerpos de inclusión en Escherichia coli. Foto tomada de (Gergiou G; 1999).*

Los genes de organismos eucariotas son transcritos en ARNm los cuales incluyen codones de aminoácidos de poca frecuencia en *E. coli* causando baja expresión de proteínas, proteínas truncadas o incompletas (Kane, 1995).

Así mismo los factores externos que afectan en la cantidad, solubilidad y el replegamiento de las proteínas son el medio de expresión, la temperatura, el inductor y el tiempo de inducción (Francis D.M, Page R., 2010). La temperatura es un factor importante, algunas proteínas precipitan cuando son expresadas a 37°C; sin embargo, a 15-25°C, son solubles debido a que tendría más tiempo para el plegamiento a una manera nativa. Al usar menores temperaturas se debe prolongar el tiempo de inducción, por la menor tasa de crecimiento bacteriano (Structural Genomics Consortium et al; 2008). La cantidad del inductor, IPTG, puede afectar de manera muy significativa en la solubilidad y expresión de una proteína, la concentración de IPTG puede tener que ser optimizada para cada proteína en las condiciones utilizadas (Turner et al; 2005). (Figura No 6). Para la obtención de la proteína, las células son lisadas, mediante sonicación, lisis enzimática con lisozima, congelación-descongelación y homogenización. La sonicación, técnica más usada, se basa en ondas de ultrasonido con velocidad de 20 KHZ (Pety and Page; 2007). Los cuerpos de inclusión se solubilizan generalmente con agentes como urea, guanidina y detergentes iónicos, tales como N-lauroilsarcosina (Gierasch et al; 1982).

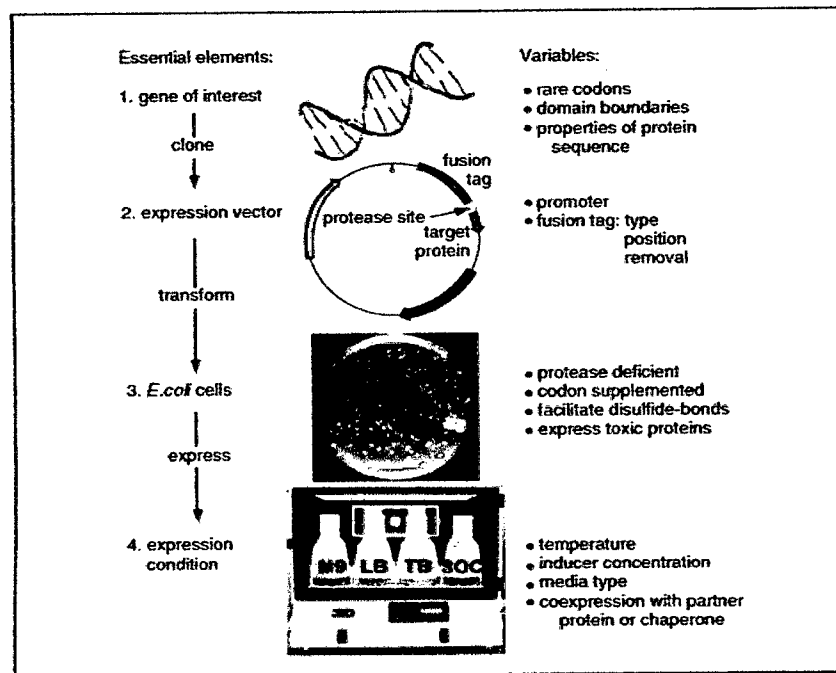


Figura N° 6: Vista general esquemática de los temas tratados en la revisión, destacando los parámetros (derecha) que afectan la expresión soluble (Francis D.M, Page R., 2010).

❖ **Purificación:** La purificación de la expresión de proteínas recombinantes con cola de histidinas se realiza mediante cromatografía de afinidad usando columnas de His Trap (HT) las cuales son columnas que presentan una matriz de sepharosa unidas a iones metálicos. Los iones se unen a las proteínas a través de la cola de histidinas debido a su alta afinidad; el ion más usado es Ni^{+2} , pero esto se puede variar usando otros iones como Zn^{+2} y Co^{+2} (Manual Amershan Biosciences, 2012).

❖ **Replegamiento.** El replegamiento de una proteína es el cambio de conformación de la proteína, de una conformación no nativa o mal plegada a una conformación nativa o bien plegada. En el replegamiento es necesario remover los agentes denaturantes (úrea o guanidina) usados en la solubilización previa (Tsumoto K.; et al; 2002). Cada proteína requiere de un procedimiento diferente de solubilización y replegamiento hallados experimentalmente. (Sambrook J., et al; 2001). El replegamiento puede realizarse mediante diálisis, por diluciones, con columnas de afinidad, entre otros. (Tsumoto K.; et al; 2002).

Proteínas solubilizadas en úrea fueron replegada mediante diálisis usando un amicon y concentraciones descendentes de úrea (Zugen Chen, et al; 1991) (Jeong K.J., Lee S.Y.; 1999), proteínas solubilizadas en guanidina fueron replegadas con buffer sin guanidina mediante diálisis o una columna de cromatografía usando buffer de replegamiento (Cash H.L., et al; 2006) (Oullette Thomas, et al; 2003).

Para la estimación de la concentración de proteínas, se usa el método de Bradford, el cual usa albúmina sérica bovina (BSA) como estándar (Matsubara K., et al; 2003) El método de Bradford consiste en determinar la cantidad de proteína, mediante la unión de comassie Brilliant Blue G-250 a la proteína de interés (Bradford Marion, 1976).

1.5. ESTUDIO PRELIMINAR

Este trabajo de tesis es parte del proyecto “Transplanted proteins as new vaccine carriers” financiado por ICGEB del cual también se elabora una tesis de maestría. Para probar el principio de un epítoto transplantedo en la superficie de una proteína sérica (albúmina) se usaron tres epítotoes de la proteína hemaglutinina del virus de la influenza A /Wuhan/359/95, que generan una respuesta de anticuerpos neutralizantes en ratones (Li, 2003). Para ello se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la región HA1 (región de unión a la célula huésped) de la hemaglutinina (GenBank: AF038268.1) con el fin de generar un modelo teórico por homología. De acuerdo con el modelo teórico generado utilizando una plantilla adecuada de Protein Data Bank (PDB ID: 1hge) se observó que estos epítotoes inmunogénicos son principalmente 'bucles' distribuidos en la superficie de la hemaglutinina y expuesta al disolvente (Figura 7).

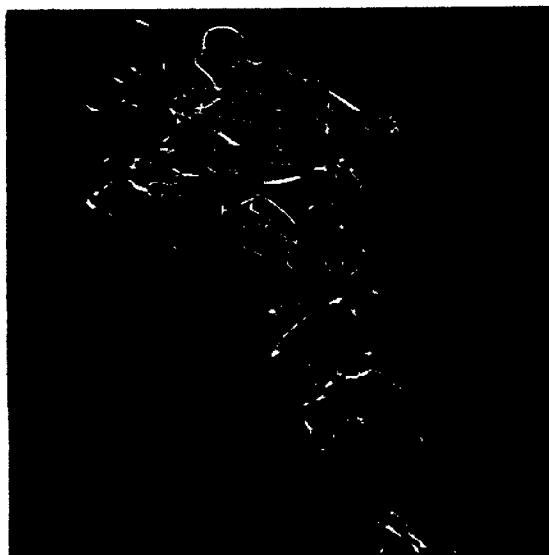


Figura N° 7: *Modelo teórico de H3N2 influenza hemaglutinina A/Wuhan/359/95. Los 3 epítopes inmunogénicos/protección se muestran en rojo (epítope 1), azul (epítope 2) y amarillo (epítope 3), donde la estructura secundaria de tipo bucle y la orientación disolvente es apreciable.*

Mediante el uso de herramientas de bioinformática estructural y modelado molecular, y después de una búsqueda de posibles proteínas de suero de mamíferos que pueden ser "anfitrión" para el trasplante de estos epítopes, se determinó que la albúmina de ratón es apto para el trasplante. Se modeló la albúmina de ratón, usando la aproximación por homología de la estructura cristalina de la albúmina humana (PDB ID: 1AO6). La estructura geométrica modelada fue refinada mediante minimización de la energía y dinámica molecular de la proteína solvatada. (Figura No 8).



FiguraN° 8: *Modelo teórico de la albúmina de ratón. Muestra los dominios estructurales de proteínas globulares compuestas por única hélice alfa y bucles*

Se buscaron regiones similares en la proteína albúmina de ratón, usando programas de alineación y se realizó el reemplazo manualmente, conservando la estructura de la proteína, y la estructura de los epítopes cuando se encuentra en la hemaglutinina, esto fue corroborado por dinámica molecular, con lo que se aserva la conformación tridimensional de la proteína con los epítopes transplantados y sus propiedades fisicoquímicas.

| Influenza-A hemagglutinin epítopes | Mouse serum albumin region | Orientation |
|---------------------------------------|-------------------------------|-------------|
| KAYSNCYPYDVPDY | V492-F508 | Similar |
| HPSTSDQTSIY | N266-P281 | Similar |
| WTGVAQD | T556-D564 | Similar |

Tabla N°1: *Regiones de orientación similar a los epítopes de hemaglutinina de la influenza A en la albúmina de ratón.*



Figura N°9: *Epítotope 1, trasplantado a la superficie de la albúmina de ratón.*

En el presente trabajo se utilizó el diseño de la albúmina de ratón con el epítotope número 1, (KAYSNCYPYDVDPY) en la posición 492-508, para probar el modelo planteado.

FORMULACION DE OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL:

Evaluar la Inmunogenicidad del epítotope 4 de hemaglutinina de influenza A H3N2 transplantado en albúmina de ratón.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- ❖ Obtención de la proteína albúmina de ratón con el epítotope de influenza H3N2 transplantado producida en *Escherichia coli*.
- ❖ Determinación y cuantificación del tipo de respuesta inmune que genere la proteína.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima.

2.2. METODOLOGÍA

2.2.1. Generación del gen de la albúmina de ratón con el epítipo de influenza H3N2 en el vector pET28a (pET28a: Alb: Ep4).

Obtención de pET28a: Alb: Ep4. El plásmido pET28a: Alb: Ep4 fue sintetizado por la empresa GENEMED. Los nucleótidos del gen de albúmina de ratón y el epítipo de hemaglutinina de Influenza A fueron modificados de acuerdo al codón usage de *E. coli*.

Transformación de plásmidos en *E. coli* Novablu y extracción de plásmidos. La transformación de plásmido pET28a: Alb: Ep4 en *E. coli* Novablu se realizó usando el protocolo de shock térmico (Anexo 1). El plásmido se extrajo con el kit comercial High Plasmid Isolation Kit (ROCHE). El plásmido confirmado con el inserto fue guardado a -20° C. (Anexo 2).

Digestión de pET28a: Alb: Ep4. Se realizó una digestión simple y una digestión doble del plásmido con el inserto usando con el objetivo de liberar al fragmento de ADN conteniendo al gen de la albúmina más el epítipo 4 (Anexo 3 y 4).

Transformación de pET28a: Alb: Ep4 a células *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. pET28a: Alb: Ep4 fue transformado en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS usando shock (Anexo 1).

2.2.2. Expresión, purificación, concentración, cuantificación y replegamiento de la proteína albúmina de ratón con el epítipo de influenza H3N2 (Alb+Ep4).

➤ Expresión de Alb+Ep4

La expresión de la proteína recombinante, Alb+Ep4 se realizó de acuerdo al protocolo usado por (Pandjaitan et al; 2000). En breve, Alb+Ep4 fue expresado en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS mediante la inducción con IPTG. El contenido bacteriano fue separado mediante centrifugación y resuspendido en Binding Buffer (Anexo 5). Las bacterias fueron lisadas mediante sonicación para liberar las proteínas (Li H et al; 2003) (Anexo 6). El extracto obtenido fue centrifugado, la fracción soluble conteniendo a las proteínas solubles fue separada y la fracción insoluble conteniendo a las proteínas insolubles fue solubilizada con urea. (Anexo 7). Las proteínas de ambas fracciones fueron caracterizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Sambrock, 2001). (Anexo 8). Se evaluaron las siguientes condiciones de expresión: Temperatura de inducción (23°C y 30°C); el tiempo de inducción (4 y 6 horas), y la concentración del inductor IPTG (0.5 mM y 1mM).

➤ Purificación y concentración de Alb+Ep4.

La purificación de la proteína recombinante del extracto soluble e insoluble se realizó mediante cromatografía de afinidad, usando columnas Hi Trap (Ver anexo No 9). Para la concentración de proteínas se usó los protocolos de (Ouellete; 2003); (Jeong Kj, Lee SY; 1999) y (Millipore; 2008). (Anexo 10). Las fracciones obtenidas en la purificación fueron analizadas mediante SDS-PAGE, las fracciones que presentaron a la Alb+Ep4 fueron mezclados y concentrados mediante ultracentrifugación (Amicon).

Los buffer usados variaron de acuerdo al tipo de proteína si esta era soluble o insoluble. La concentración de proteína en las soluciones resultantes fueron determinadas mediante el método Bradford (Bradford M., 1976) y el Manual de Proteína (Assay Bio-Rad, 2012). La medición consistió en preparar una curva de calibración de concentraciones y de la muestra problema de proteína a diferentes

diluciones, y hacerla reaccionar con el reactivo de Bradford y medir su densidad óptica para estimar su concentración. (Anexo 11).

➤ **Replegamiento de proteína**

El proceso de replegamiento de Alb+Ep4, se realizó de acuerdo al protocolo de (Burton, S; Quirk A y Wood C, 1988). En breve, la proteína fue diluida y luego dializada con el objetivo de disminuir de manera progresiva la concentración del denaturante (Anexo 12).

2.2.3. Determinación de Zn^{+2} en Alb+Ep4 mediante absorción atómica (AA).

Para evaluar de manera indirecta el adecuado replegamiento de la proteína recombinante, se midió la capacidad de captura de moléculas de zinc, por ALB+Ep4 y la Alb nativa de ratón de origen comercial; y de esta manera saber el % correcto de ALB+Ep4 replegado por diálisis. Las mediciones de zinc de las muestras se realizaron por medio de un equipo de absorción atómica de flama.

El experimento se diseñó para trabajar en función de concentraciones pequeñas y expresadas en milimolar (mM). La concentración de proteína usada en los experimentos fue de 0.000554 mM, tanto para la ALB+Ep4 como para la Alb nativa de ratón.

Se preparó una curva de calibración de un stock de sulfato de zinc (1gr/litro), la curva tubo las siguientes concentraciones: 0.00025 mM, 0.000500 mM, 0.00100 mM, 0.00150 mM, y 0.00200 mM. Dichas concentraciones de zinc contenían igual, doble y triple concentración de la proteína. Luego, las proteína (sea ALB+Ep4 o Alb nativa) fueron mezcladas con el stock sulfato de zinc y buffer 20 mM Tris-HCl hasta un volumen de 10 ml, en la cual la concentración de proteína fuera de 0.000554mM y la concentración de zinc a 0.000554 mM; para el primer experimento, el doble para el segundo, el triple para el tercero.

Finalmente, se usó 0.000554 Mm de proteína (ALB+Ep4) y Alb nativa de ratón) y el doble de esta concentración de zinc. Asimismo, se evaluó la retención de zinc por parte del sistema usado (concentrador Amicon y la membrana con poros de 10kDa) a una concentración de solución de zinc de 0,00200 mM disuelta en buffer 20 mM Tris-HCl a un volumen de 10 ml total. El cálculo de % de retención fue estimado de la siguiente manera:

$$[\text{Zn}]_o - [\text{Zn}]_F = \text{Zn retenido por el sistema. } 100\%$$

Este valor fue restado del $[\text{Zn}]$ retenido de los experimentos con las proteínas ALB+Ep4 y Alb nativa de ratón para hallar los valores de constante de afinidad K_a de ambas proteínas.

Las muestras fueron incubadas 4 horas a 25°C en movimiento. Se separó 5 ml para medir la concentración de zinc inicial $[\text{Zn}]_o$. Los otros 5 ml fueron ultrafiltrados en Amicon y recolectados (zinc final $[\text{Zn}]_F$) (figura No 10). El mismo proceso se realizó para la evaluación de la retención por parte del sistema usado.

También se realizó mediciones de zinc al stock de las proteínas (ALB+Ep4 y Alb nativa de ratón) y el buffer 20 mM Tris-HCl, esto para evitar cualquier falso positivo en los resultados.

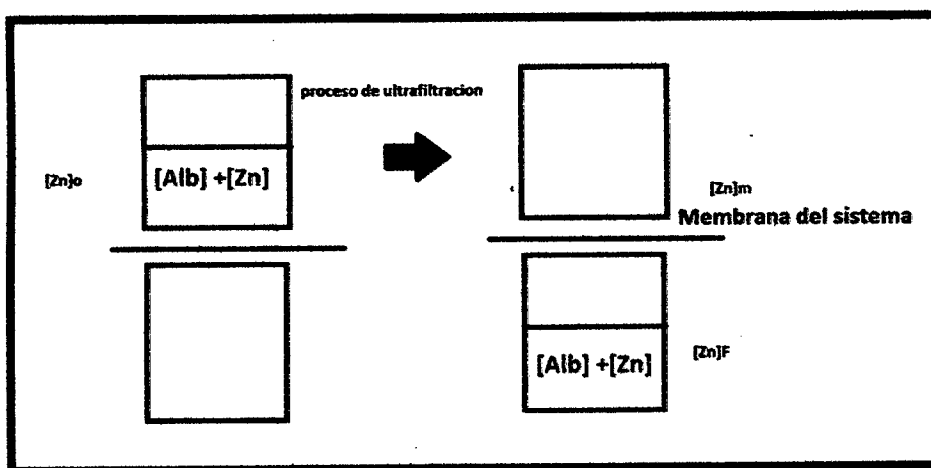


Figura N°10: Captura de zinc por la albúmina. $[\text{Zn}]_o$, $[\text{Zn}]_F$ y $[\text{Zn}]_m$, corresponde a concentración de zinc inicial, final y atrapado en la membrana respectivamente.

En base a este proceso se diseñó la siguiente ecuación para los experimentos con proteína y zinc:

$$[\text{Zn}] \text{ retenido} = [\text{Zn}]_o - [\text{Zn}]_F = \alpha \beta [\text{ALB}] \quad (1)$$

$$[\text{Zn}]_o - [\text{Zn}]_F = \alpha \beta [\text{ALB}] + [\text{Zn}]_m \quad (2)$$

Definición de $[\text{Zn}]_m = \% \text{ retención}$. $[\text{Zn}]_o$ y $[\text{ALB}]$ es la concentración de proteína usada.

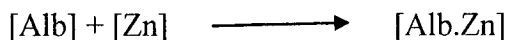
Entonces:

$$[100\% - \% \text{ retención}] [\text{Zn}]_o - [\text{Zn}]_F = \alpha \beta [\text{ALB}] \quad (3)$$

El α es la estequiometría de cuantas moléculas puede unir una molécula de albúmina.

β es el % de replegamiento de la proteína. Después Este β es adaptado al Gold estándar que sería la albúmina nativa de ratón de origen comercial, para obtener el valor de % correcto de replegamiento.

Se trabajó de la siguiente manera para la constante de afinidad K_a :



$$K_a = \frac{[\text{Alb.Zn}]}{[\text{Alb}]_L [\text{Zn}]_L}$$

Definiendo:

$[\text{Alb.Zn}]$ = albúmina unida a zinc

$[\text{Alb}]_L$ = albúmina libre no unida

$[\text{Zn}]_L$ = zinc libre no unido

$\% [\text{Zn}]_m = 100\% - \% \text{ retención}$.

Trabajamos los datos en bruto y con la corrección de la retención por el sistema de Amicon.

Para los K_a trabajados con la corrección se usaron los siguientes arreglos para hallar, $[\text{Alb}]_L'$, $[\text{Zn}]_L'$ y $[\text{Alb.Zn}]'$.

Sabemos:

$$[\text{Zn}]_o - [\text{Zn}]_F = \% [\text{Zn}]_m \cdot [\text{Zn}]_o + [\text{Alb.Zn}]'$$

$$[\text{Alb.Zn}]' = [\text{Alb.Zn}] - \% [\text{Zn}]_m \cdot [\text{Zn}]_o$$

$$[\text{Zn}]_L' = [\text{Zn}]_F + \% [\text{Zn}]_m \cdot [\text{Zn}]_o$$

2.2.4. Inmunización de ratones

2.2.4.1. Inmunización con Alb+Ep4, albúmina nativa y epítope4 (Ep4)

Treinta ratones del tipo Balb/c de género femenino, de 3 meses de edad fueron divididas en 3 grupos. Cada grupo fue inmunizado con los siguientes antígenos: Alb+Ep4, albúmina de ratón nativa, y Ep4. Cada dosis fue administrada intraperitonealmente y consistió en 10 ug de antígeno + 10 ug del adyuvante QUILL A, en 200 ul de suero fisiológico (Li H et al; 2003).

El diseño de aplicación de dosis y sangría de los ratones fue el siguiente:

- Día 0: Sangrado para obtener sueros pre-inmune
- Día 5: Administración primera dosis de la vacuna
- Día 10: El sangrado para obtener sueros inmunes (después de primera dosis)
- Día 14: Segunda administración de una dosis de la vacuna
- Día 20: El sangrado para obtener sueros inmunes (después de segunda dosis)
- Día 26: Tercera administración de una dosis de la vacuna
- Día 32: El sangrado para obtener sueros inmunes (después tercera dosis)

El suero fue separado de la sangre total de la siguiente manera: 200 ul de sangre se centrifugó a 3500 rpm por 15 min. El proceso se repitió dos veces para extraer el máximo de suero de cada muestra de sangre (Donayre-Torres AJ et al; 2009).

2.2.4.2. Determinación de anticuerpos mediante el inmunoensayo ELISA

La presencia de anticuerpos específicos en el antisuero contra su propio antígeno (Alb+Ep4, albúmina nativa de ratón y Ep4), la relación entre antisueros y los antígenos fueron evaluados (Donayre-Torres et al; 2009) y (Crowther J. R; 2002). Se probó las siguientes variables, concentración de antígeno 2 ug/ml y

dilución de suero 1:100; para ver diferencia entre los sueros de cada vacuna con su propio antígeno y 5 ug/ml de antígeno Ep4 y diluciones de suero de 1/20, las cuales permitieron obtener diferencias en las respuestas inmunes entre las vacunas en base a ALB+Ep4 y Ep4. Se trabajó usando pules, se hicieron dos grupos sueros pre-inmunes y post-inmunes (primer, segundo y tercer suero post-inmune) (Anexo 13).

2.2.5. Análisis estadístico

En el análisis estadístico se usó la prueba de regresión múltiple para comparar lecturas de densidad óptica (OD) entre las vacunas de interés, para observar la diferencia de la generación de anticuerpos específicos contra el epitope de influenza H3N2, y se usó la prueba de Kruskal Wallis para comparar la cinética de las vacunas en el tiempo, referido a la generación de anticuerpos.

RESULTADOS

3.1. Verificación de la presencia del gen de albúmina pET28a: Alb: Ep4

La presencia del gen alb más el ep4 fue verificado en el plasmido pET28a: Alb: Ep4 enviado por GENEMED mediante cortes con enzimas de restricción. La liberación del inserto (alb más el ep4) de 1752 corroboró su presencia (Figura No 11).

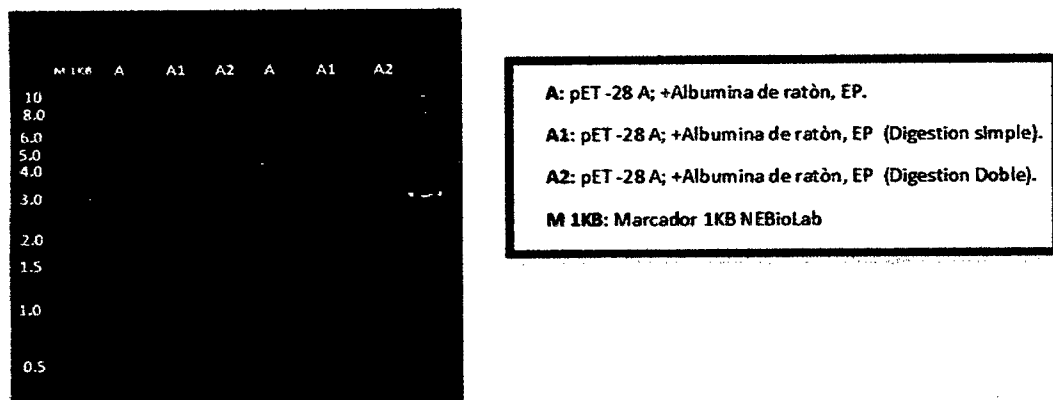


Figura N°11: Verificación de la presencia del gen de albúmina gen de albúmina pET28a: Alb: Ep4. En gel de electroforesis al 1% de agarosa. Número de bases de pET-28^a, 5369 bp, y de gen de la albúmina con ep4, 1752 b

3.2. Expresión de Alb+ep4

La ALB+EP4 fue expresado en E. coli BL21 (DE3) pLysS en diferentes condiciones (Tabla No 2): Tabla resumen de las condiciones de expresión probadas.

| Temperatura de inducción (°C) | Tiempo de inducción (h) | Concentración de IPTG (mM) | Figura |
|-------------------------------|-------------------------|----------------------------|--------|
| 23 | 4 | 0.5 | 12 |
| 23 | 6 | 0.5 | 13 |
| 23 | 4 | 1 | 14 |
| 23 | 6 | 1 | 15 |
| 30 | 4 | 0.5 | 16 |
| 30 | 4 | 1 | 17 |

Tabla N°2: Resumen de los condiciones de expresión de la proteína Alb+Ep4.
SDS-PAGE de las condiciones probadas para la expresión de ALB+EP4.

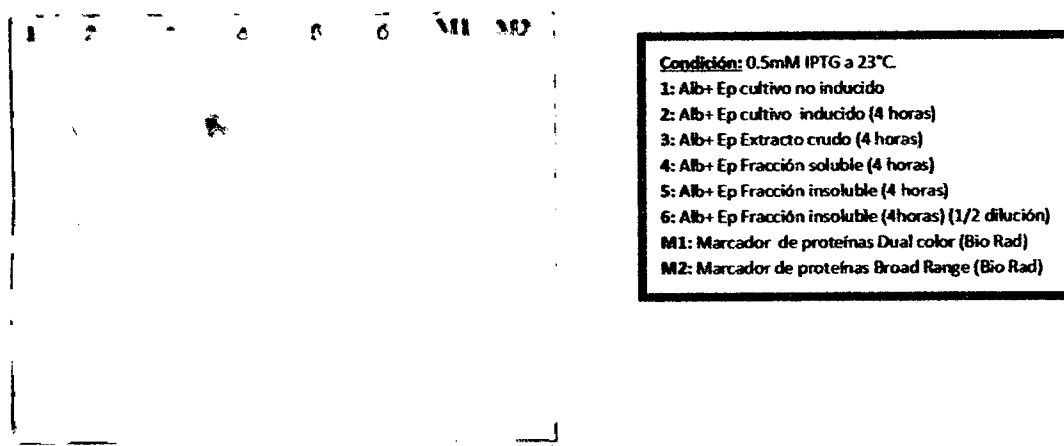


Figura N°12. SDS-PAGE de la expresión de Alb+Ep4, inducido a 23°C por 4 h y 0.5 mM de IPTG. La flecha indica la banda de expresión de Alb+Ep4 de 67KDa.

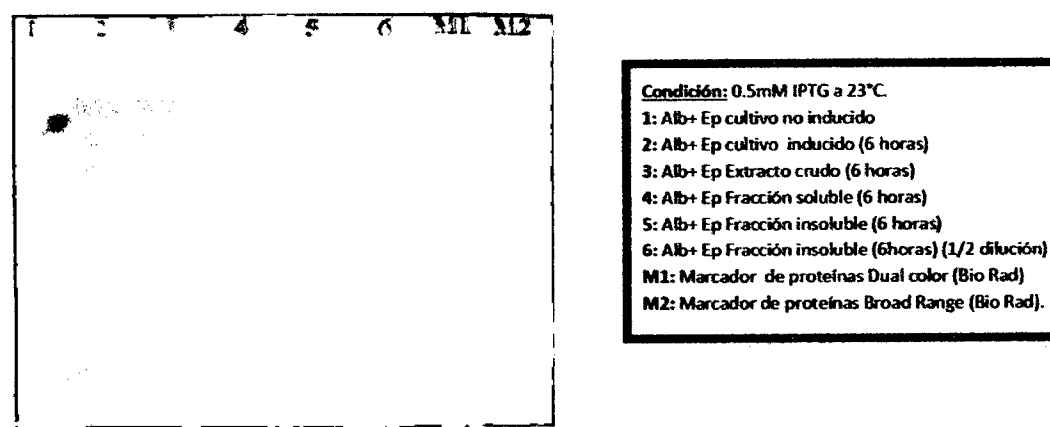
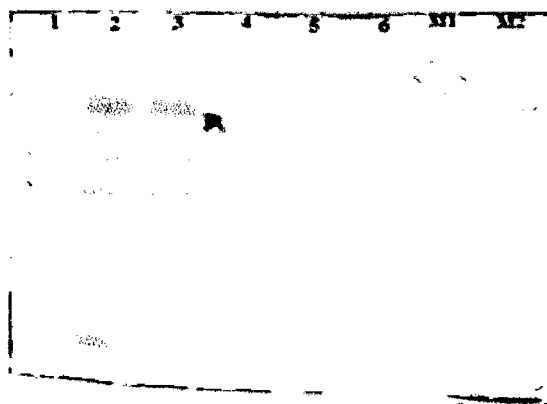


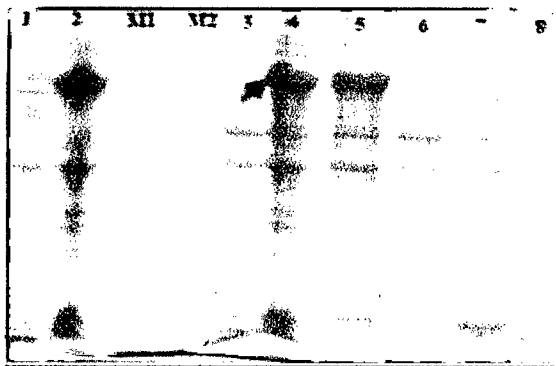
Figura N° 13. SDS-PAGE de la expresión de Alb+ep4 inducido a 23°C por 6 h y 0.5 mM de IPTG.. La flecha indica la banda de expresión de alb+ep4 de 67Kda



Condición: 1 mM IPTG a 23°C.

- 1: Alb+ Ep cultivo no inducido
- 2: Alb+ Ep cultivo inducido (4 horas)
- 3: Alb+ Ep Extracto crudo (4 horas)
- 4: Alb+ Ep Fracción soluble (4 horas)
- 5: Alb+ Ep Fracción insoluble (4 horas)
- 6: Alb+ Ep Fracción insoluble (4 horas) (1/2 dilución)
- M1: Marcador de proteínas Dual color (Bio Rad)
- M2: Marcador de proteínas Broad Range (Bio Rad).

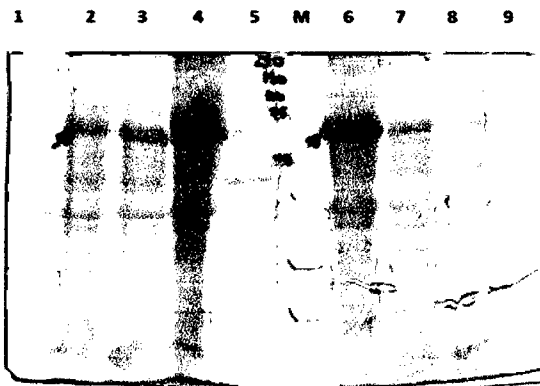
Figura N° 14: SDS-PAGE de la expresión de Alb+ep4 inducido a 23°C por 4 h y 0.5 mM de IPTG. La flecha indica la banda de expresión de alb+ep4 de 67KDa.



Condición: 1mM IPTG a 23°C.

- 1: Alb+ Ep cultivo no inducido
- 2: Alb+ Ep cultivo inducido (6 horas)
- 3: Alb+ Ep cultivo no inducido
- 4: Alb+ Ep cultivo inducido (6 horas)
- 5: Alb+ Ep Extracto crudo (6 horas)
- 6: Alb+ Ep Fracción soluble (6 horas)
- 7: Alb+ Ep Fracción insoluble (6 horas)
- 8: Alb+ Ep Fracción insoluble (6 horas) (1/2 dilución)
- M1: Marcador de proteínas Dual color (Bio Rad)
- M2: Marcador de proteínas Broad Range (Bio Rad).

Figura N° 15: SDS-PAGE de la expresión de Alb+ep4 inducido a 23°C por 4 h y 0.5 mM de IPTG. La flecha indica la banda de expresión de alb+ep4 de 67Kda.



Condición: 0.5 mM IPTG a 30°C.

- 1: Alb+ Ep cultivo no inducido
- 2: Alb+ Ep cultivo inducido (4 horas)
- 3: Alb+ Ep Extracto crudo (4 horas)
- 4: Alb+ Ep proteína total (4 horas)
- 5: Alb+ Ep Fracción soluble (4 horas)
- 6: Alb+ Ep Fracción insoluble (4 horas)
- 7: Alb+ Ep Fracción insoluble (4 horas) (1/2 dilución)
- 8: Alb+ Ep Fracción insoluble (4 horas) (1/4 dilución)
- 9: Alb+ Ep Fracción insoluble (4 horas) (1/4 dilución)
- M: Marcador de proteínas Dual Color (Bio Rad)

Figura N° 16. SDS-PAGE de la expresión de Alb+ep4 inducido a 23°C por 4 h y 0.5 mM de IPTG. La flecha indica la banda de expresión de alb+ep4 de 67Kda.

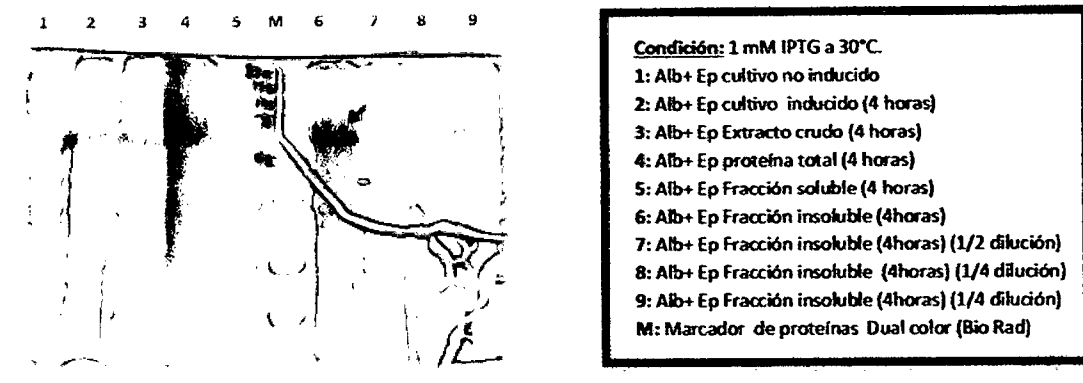


Figura N° 17: Electroforesis de gel SDS-PAGE al 12%, muestra ALB+Ep4 a diferentes condiciones: temperatura de inducción de 30°C; tiempo de inducción de 4 h y 1 mM de IPTG. La flecha indica la banda de expresión de albúmina de ratón de 67KD.

Para un mejor control, se expresó las proteínas propias de *E. coli* BL21pLysisS con plásmido pET28a sin inserto de Alb+Ep4, y se observó que no hubo sobreexpresión de ninguna proteína propia de la bacteria.

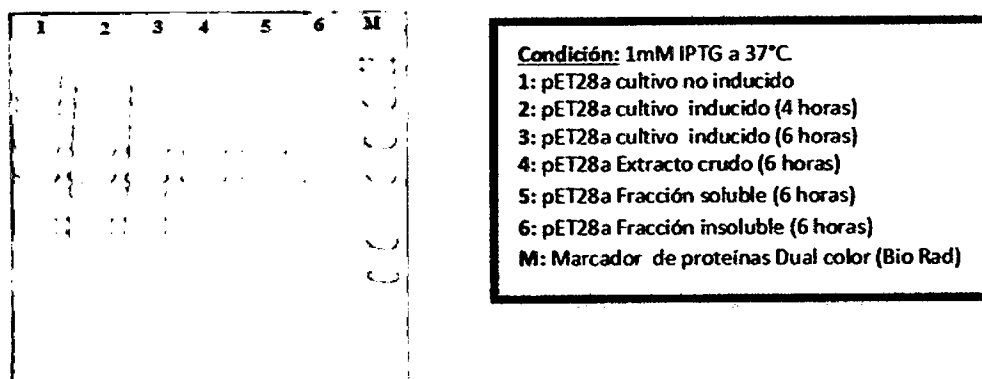


Figura N° 18: SDS-PAGE al 12%. Muestras de *E. coli* BL21pLysisS con plásmido pET28a sin inserto, a la condición de una temperatura de inducción a 37° C, con tiempos de inducción de 4 y 6 h y 1 mM de IPTG.

La mejor condición de expresión fue inducción de 4 h a 30°C, y 0.5mM de IPTG. La proteína fue expresada en 2 litros de medio en 4 matraces con cantidades de 500 ml y se corrieron cada uno de las muestras para observar: Cultivo no inducido (NI); cultivo inducido (I), Extracto crudo (I), Fracción soluble (A) y Fracción insoluble (B).

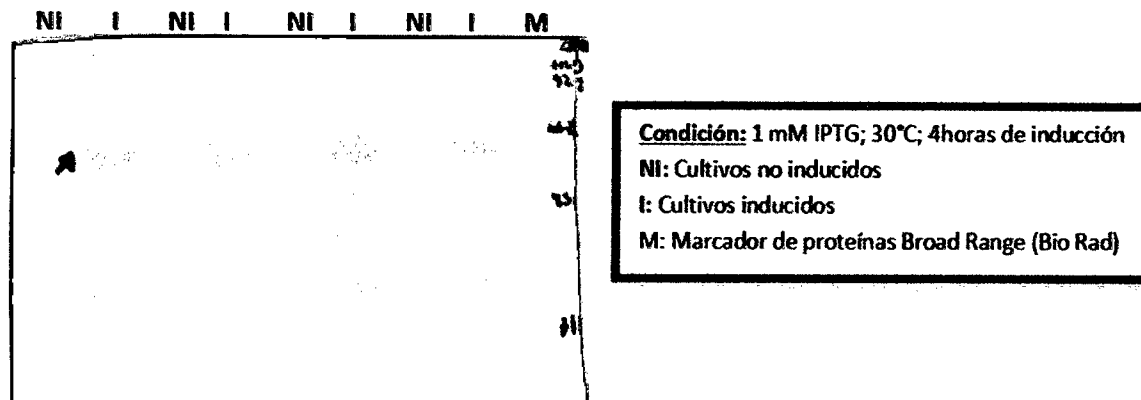


Figura N° 19: SDS-PAGE de la proteína Alb+Ep4, donde se observa el cultivo sin inductor (NI) y el cultivo con inductor (I). La flecha indica la banda de expresión de la proteína de peso de 67KDa.

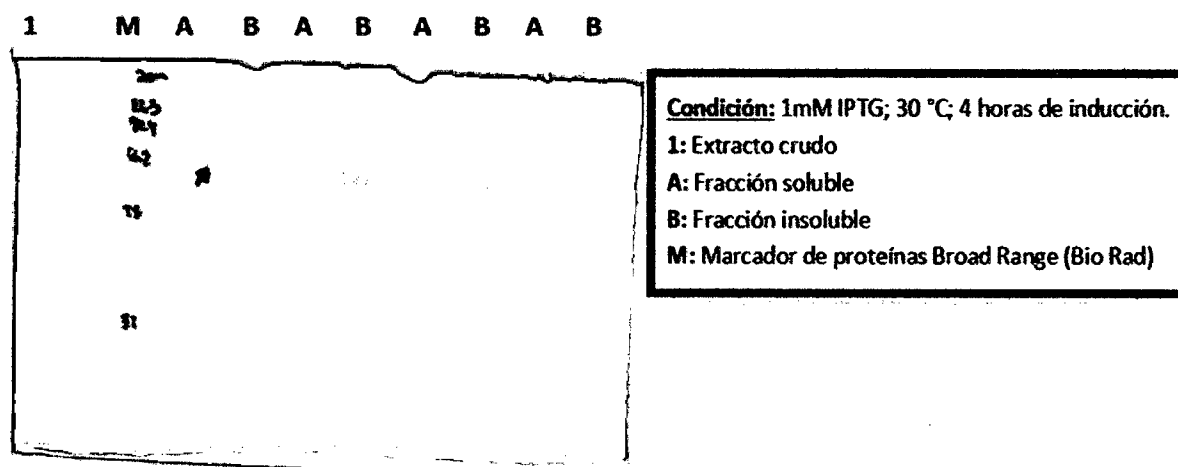


Figura N° 20: SDS-PAGE de la proteína Alb+Ep4, donde se observa el extracto crudo (1), la fracción soluble (A) y la fracción insoluble (B). La flecha indica la banda de expresión de albúmina de ratón de 67KDa.

3.3. Purificación de proteínas: Alb+Ep4

Una vez obtenido la proteína en la fracción insoluble fue resuspendido en buffer A, 8 M de úrea con Imidazol, esta se guardó a -20°C. La proteína fue purificada mediante cromatografía de afinidad usando la columna His-trap (Pharmacia, Sweden) usando buffer 20mM fosfato de sodio a diferentes concentraciones de Imidazol (20mM, 40mM, 60mM, 100mM, 300mM y 500mM) y todos con 8 M de úrea. La proteína fue observada en SDS-PAGE en las fracciones eluidas. En las fracciones eluidas con 60mM de Imidazol (Fracciones 16-19), se apreció una ligera banda a la altura de la proteína de interés en las fracciones, con 100mM de Imidazol (Fracciones 20-26) se observó la presencia de una banda bien definida; con 300 mM de Imidazol (Fracciones 27-33) se observó una banda fuerte de proteína (fracción 27) con 500 mM de Imidazol (Fracciones 34-36) no hubo presencia de proteína. (Figura 21).

El registro de la cromatografía de afinidad muestra elevaciones de picos justo donde empieza a eluir la proteína con los buffer de purificación con las concentraciones de 60mM, 100mM, y 300 mM, de Imidazol, donde fue más apreciativo fue en el buffer de concentración de 100mM y 300 mM. (Figura 21).

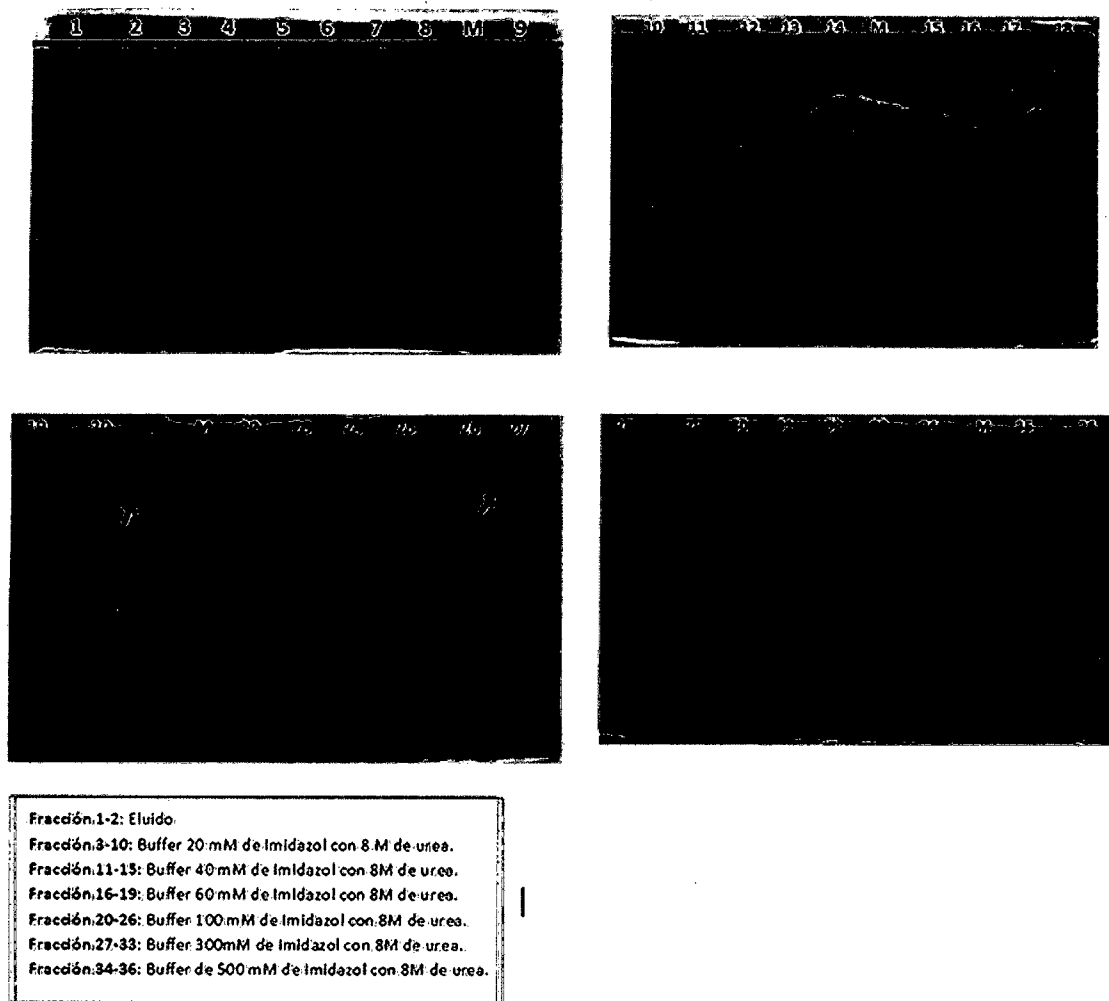


Figura N° 21. Electroforesis de gel SDS-PAGE al 12%, de las fracciones colectadas de la purificación por cromatografía de afinidad usando la columna His-Trap de 5 ml. Las flechas indica el peso de la albúmina transplantada de 67KDa. El marcador de proteínas usado es Broad Rand.

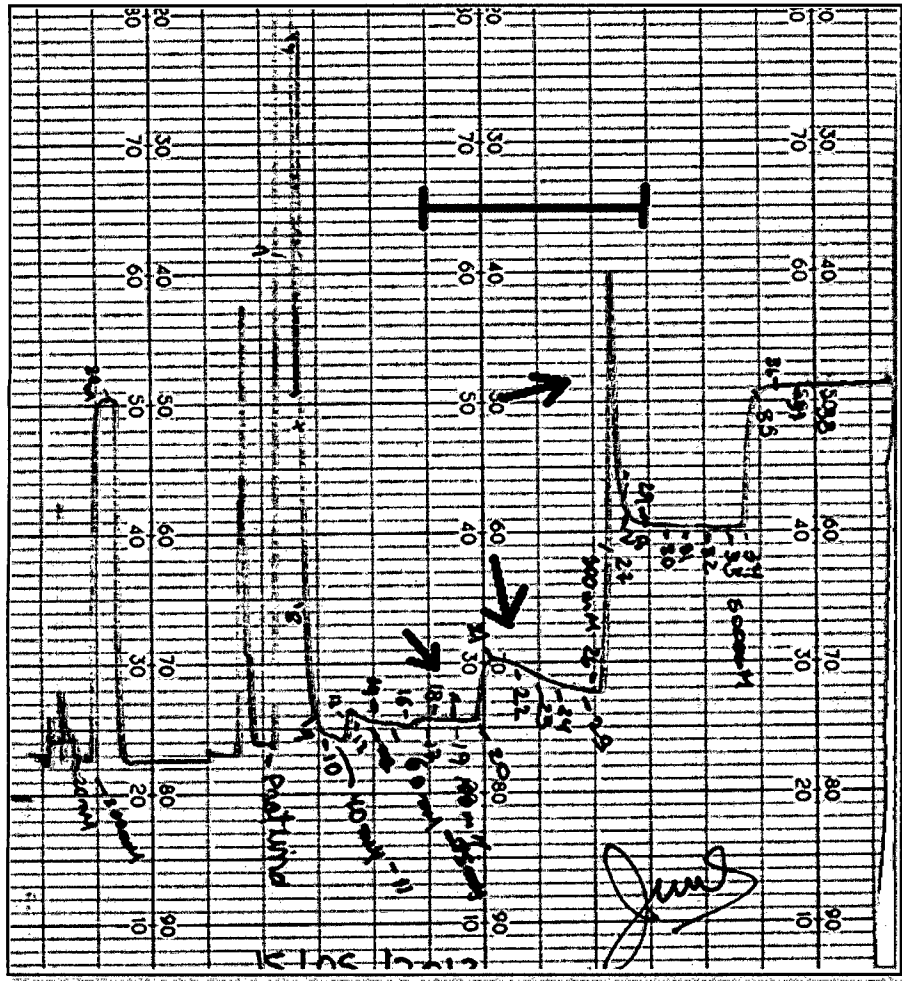


Figura N° 22. Cromatografía de la purificación de la albúmina de ratón con el epítipo transplantado. Las flechas señalan los puntos de formación de picos que corresponden a la detección de la proteína eluida. Se detectó eluido de proteína desde la fracción 18 hasta la 28, como se corrobora en la electroforesis de gel de SDS-PAGE al 12%. Los buffers que eluyen la proteína de la columna, empiezan desde 60 mM de imidazol, 100 mM de imidazol y 300 mM de imidazol, todos con úrea 8M.

3.4. Determinación de la concentración de proteína: Alb+Ep4

El ensayo de Bradford usando albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar a diversas concentraciones dio; como resultado una concentración de la proteína Alb+Ep4 de 2,059 ug / ml o 2mg/ml.

| Unknowns | | | | | | | | | |
|----------|-------|-----------|---------------|----------|-------|------|----------|----------|--|
| Sample | Wells | OD Values | Concentration | MeanConc | SD | CV | Dilution | AdjConc | |
| alb.100 | A3 | 0.401 ✓ | 17.178 | 18.117 | 1.328 | 7.3 | 100.0 | 1811.659 | |
| | A4 | 0.408 ✓ | 10.055 | | | | | | |
| alb.200 | B3 | 0.365 ✓ | 8.017 | 9.007 | 1.400 | 16.5 | 200.0 | 1801.381 | |
| | B4 | 0.373 ✓ | 9.997 | | | | | | |
| alb.25 | G1 | 0.810 ✓ | 123.195 | 125.936 | 3.876 | 3.1 | 25.0 | 3148.391 | |
| | G2 | 0.840 ✓ | 128.676 | | | | | | |
| alb.50 | H1 | 0.526 ✓ | 48.897 | 51.269 | 3.355 | 6.5 | 50.0 | 2563.402 | |
| | H2 | 0.545 ✓ | 63.642 | | | | | | |

| Standards (µg/ml) | | | | | | | |
|-------------------|---------------|--------------|-------|-----------|-------------|-------|-----|
| Sample | Concentration | BackCalcConc | Wells | OD Values | MeanODValue | SD | CV |
| S11 | 5.000 | 6.393 | A1 | 0.358 | 0.355 | 0.004 | 1.2 |
| | | | A2 | 0.352 | | | |
| S12 | 10.000 | 9.794 | B1 | 0.372 | 0.374 | 0.003 | 0.7 |
| | | | B2 | 0.376 | | | |
| S13 | 20.000 | 16.316 | C1 | 0.397 | 0.404 | 0.010 | 2.4 |
| | | | C2 | 0.411 | | | |
| S14 | 40.000 | 41.005 | D1 | 0.495 | 0.498 | 0.005 | 1.0 |
| | | | D2 | 0.502 | | | |
| S15 | 80.000 | 76.048 | E1 | 0.633 | 0.639 | 0.009 | 1.5 |
| | | | E2 | 0.646 | | | |
| S16 | 100.000 | 94.976 | F1 | 0.707 | 0.733 | 0.036 | 4.9 |
| | | | F2 | 0.768 | | | |

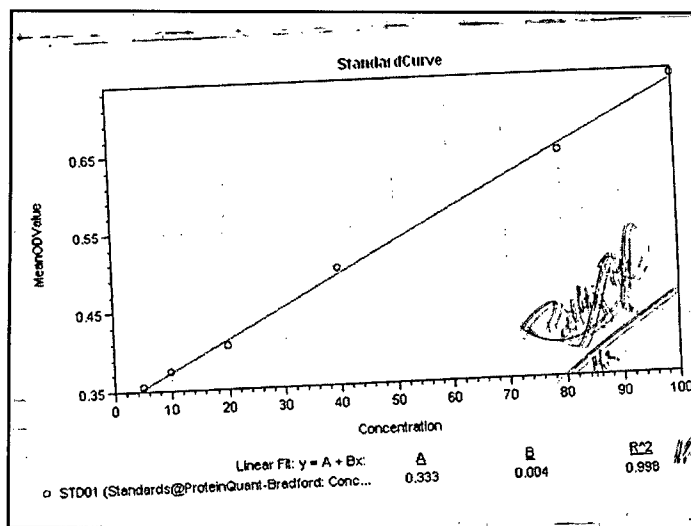


Figura N° 23: Análisis de Bradford para la cuantificación de proteínas y la curva estándar.

3.5. Replegamiento de proteína: Alb+Ep4

Después de realizado el proceso de replegamiento de la proteína Albúmina de ratón, pudimos verificar su presencia mediante una electroforesis SDS-PAGE al 12% en la suspensión en el Buffer 20 mM Tris-HCl, pH 7.3, con una banda de proteína de 67KDa. Al obtener una proteína soluble a partir de una proteína insoluble obtenida de la expresión de *E. coli* BL21pLysS, nos confiere que nuestro proceso de replegamiento es exitoso. Se determinó la concentración de la albúmina solubilizada mediante Bradford y su concentración fue de 0.318 mg/ml.

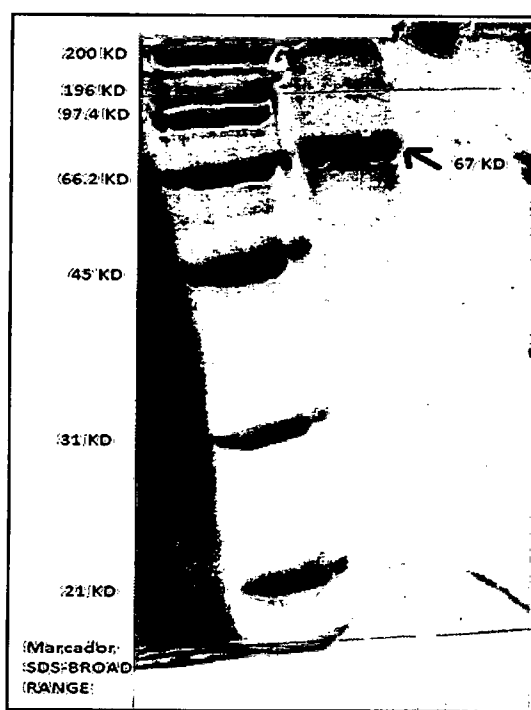


Figura N° 24: Electroforesis SDS-PAGE al 12%. Muestra de Albúmina de ratón recombinante replegada, y el marcador de proteínas SDS-BROAD RANGE.

3.6. Prueba de comprobación de replegamiento de proteína

La Tabla N° 3, se muestra los resultados de la curva de sulfato de zinc trabajada para los experimentos en partes por millón PPM, en absorbancia y en milimolar mM.

Tabla N° 3: CURVA DE CALIBRACION DE ZINC

| TABLA DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN | | |
|----------------------------------|-------------|------------|
| PPM | ABSORBANCIA | Con. mM |
| 0,01633 | 0,0013 | 0,00024977 |
| 0,0326 | 0,0029 | 0,00049862 |
| 0,0653 | 0,0051 | 0,00099878 |
| 0,098 | 0,0084 | 0,00149893 |
| 0,1307 | 0,0117 | 0,00199908 |

La tabla N° 4: muestra los resultados de la retención de zinc por el sistema de ultrafiltración, el cual fue de 3.96% del zinc inicial.

TABLA N° 4: PRUEBA DE RETENCIÓN DE ZINC POR SISTEMA DE ULTRAFILTRACIÓN

| TABLA DE LA PRUEBA DE RETENCIÓN POR SISTEMA DE ULTRAFILTRACIÓN | | | |
|--|-------------|-------------|------------|
| Muestra | ABSORBANCIA | PPM | Con.mM |
| INICIAL | 0,0123 | 0,140625 | 0,00215089 |
| ELUIDO | 0,0118 | 0,13504464 | 0,00206553 |
| DIFERENCIA RETENCIÓN | | 0,005580357 | 0,00008536 |
| DIFERENCIA EN % | | | 3,96 % |

La tabla No 5, muestra la eficiencia del procesos de replegamiento visto a través de una prueba indirecta de captura, en la cual al normalizarla con la albúmina nativa de origen comercial, usada como Gold estándar de 100% , se logró un 82% de replegamiento de la albúmina recombinante.

TABLA Nº 5: CÁLCULO DE LA EFICIENCIA DEL REPLEGAMIENTO DE LA ALBÚMINA TRANSPLATADA Y ALBÚMINA NATIVA.

| TABLA DEL CÁLCULO DE LA EFICIENCIA DEL REPLEGAMIENTO DE LA ALBÚMINA TRANSPLATADA Y ALBÚMINA NATIVA. | | | | |
|---|---------------------------------------|---------------------------------|---|--|
| MUESTRA | Valor en Mm de retención por proteína | Concentración de proteína en Mm | Eficiencia de replegamiento: Determinación del β cuando la α es 1. | Valor verdadero : contrastándolo con el Gold estándar: Albúmina nativa |
| ALBÚMINA NATIVA | 0,000466 | 0.000554 | 0,84 | 100 % |
| ALBÚMINA TRANSPLANTADA | 0,000382 | 0.000554 | 0.69 | 82% |

La tabla Nº 6, muestra los resultados de la constante de afinidad K_a , de la albúmina nativa y de la recombinante, trabajados con corrección de retención de membrana y sin esta.

TABLA No 6: CALCULO DE LAS CONSTANTES DE AFINIDAD K_a , PARA LA ALBÚMINA NATIVA Y RECOMBINANTE.

| TABLA: CALCULO DE LAS CONSTANTES DE AFINIDAD K_a , PARA LA ALBÚMINA NATIVA Y RECOMBINANTE. | | |
|--|------------------------|------------------------|
| EXPRESADO EN LOGARITMO | VALORES SIN CORRECCION | VALORES CON CORRECCION |
| ALBÚMINA NATIVA | 7.29 | 6.9 |
| ALBÚMINA RECOMBINANTE | 6.65 | 6.4 |

3.7. Inmunogenicidad de los antígenos

La inmunogenicidad de cada vacuna fue determinado mediante la medición de anticuerpos generados en la prueba de ELISA. Los resultados de cada tipo de vacuna fueron comparados estadísticamente con pruebas no paramétricas debido al número de datos obtenidos. Para la determinación de la cinética de las vacunas y el tipo de anticuerpo generado en el tiempo, se usó la prueba de Kruskal –Wallis que consiste en comparación de medianas. Para comparar la capacidad de generación de anticuerpos específicos por las vacunas de interés ALB+Ep4 y Ep4 se realizó un modelo de regresión lineal con varios factores. Se usó el programa stata 12 para los análisis estadísticos. El análisis se comparó los sueros pre inmunes versus los sueros pos inmune (primera, segunda y tercera inmunización).

3.7.1. Cinética de la generación de anticuerpos debido a Alb+Ep4

La prueba de Kruskal –Wallis mostró que al menos una mediana de los ODs de los sueros pre-inmune y post-inmunes (primera, segunda y tercera inmunización) es estadísticamente diferente ($p\text{-value} = 0.0001$), (Figura No 25.). El número de datos usados por tiempo fueron 6 repeticiones. Ver Anexo 14.

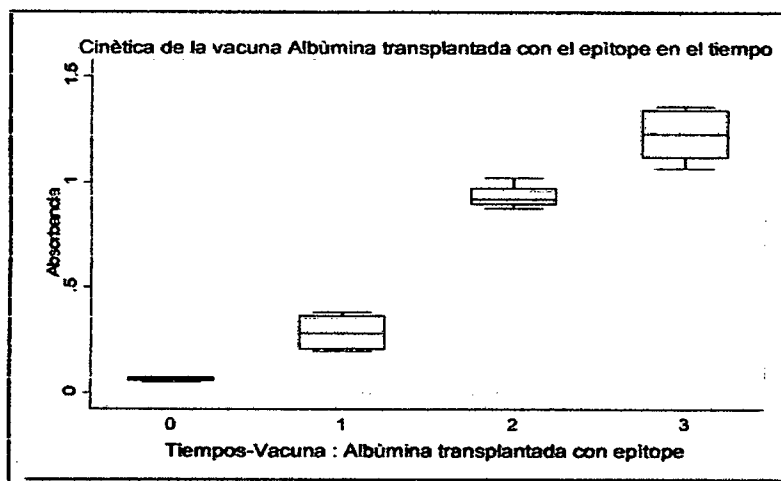


Figura N° 25: El box plot de las absorbancias vs número de sangrado, 0 (pre-inmune); 1, 2, 3 (primera, segunda y tercera post-inmunización).

3.7.2. Cinética de la generación de anticuerpos debido a la albúmina nativa comercial de ratón.

La prueba de Kruskal –Wallis mostró que las medianas de los ODs de los sueros pre-inmune y post-inmunes (primera, segunda y tercera inmunización) no son estadísticamente diferentes ($p\text{-value} = 0.1009$) (Figura No 26). El número de datos usados en la prueba fueron 3 repeticiones. Ver Anexo 15.

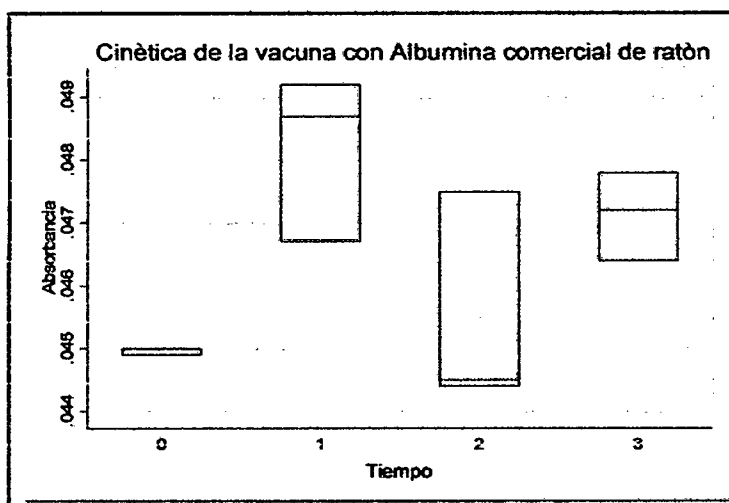


Figura N° 26: El box plot de las absorbancias en los diferentes tiempos. Tiempos de sangrado, 0 (pre-inmune); 1, 2, 3 (primera, segunda y tercera Post-inmunización).

3.7.3. Cinética de vacuna en base al antígeno, Ep4

La prueba de Kruskal –Wallis mostró que las medianas de los ODs de los sueros pre-inmune y post-inmunes (primera, segunda y tercera inmunización) no son estadísticamente diferentes ($p\text{-value} = 0.5062$) Figura No 27. Se usaron 3 repeticiones para el análisis, ver Anexo 16.

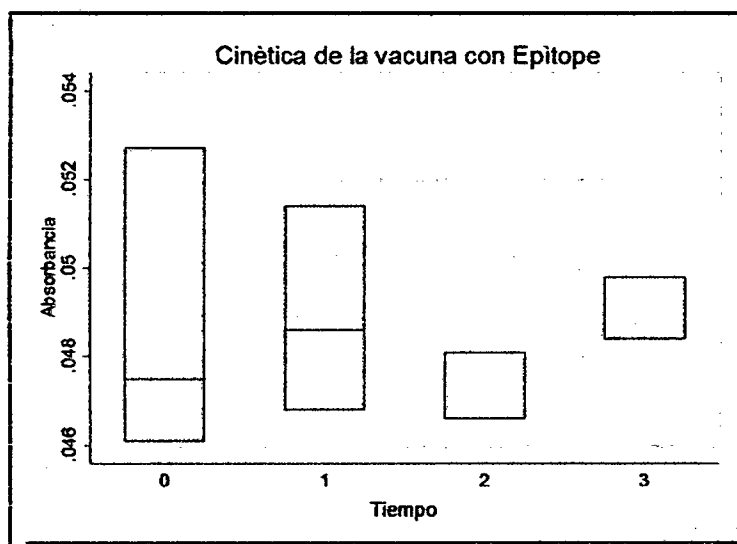


Figura N° 27: El box plot de las absorbancias en los diferentes tiempos. Tiempos de sangrado, 0 (pre-inmune); 1, 2, 3 (primera, segunda y tercera Post-inmunización).

3.7.4. Comparación de la generación de anticuerpos específicos contra Ep4, entre la vacuna de Alb+Ep4 y Ep4

Mediante una regresión lineal múltiple se evaluó la existencia de diferencia significativa entre las absorbancia de las vacunas de Alb+Ep4 (V1) y Ep4 (V2), con la premisa de que sus pendientes se cruzaban en un punto inicial. En los resultados (Figura No 28) se observa que la variable tiempo es significativa con un $p=0,000$; la variable V1V2 la cual es la relación entre la vacuna 1 y la vacuna 2, es también significativa, con un $p=0,000$; y la variable W, la cual significa el tiempo por cada vacuna tiene significancia, con un $p=0,000$; también se aprecia que el R-squared es de 0.8685, lo que significa que el 86,85% de nuestro datos se ajustan a este modelo. En base a este análisis, se puede afirmar que hay una diferencia significativa entre ambas vacunas en la generación de anticuerpos entre el tiempo del suero pre-inmune y post-inmune (primera, segunda y tercera inmunización).

| . regress absorvancia tiempo vlv2 w, noconstant | | | | | | |
|---|------------|-----------|------------|------------------------|----------------------|-----------|
| Source | SS | df | MS | | | |
| Model | .504050816 | 3 | .168016939 | Number of obs = 48 | | |
| Residual | .076328175 | 45 | .001696182 | F(3, 45) = 99.06 | | |
| Total | .58037899 | 48 | .012091229 | Prob > F = 0.0000 | | |
| | | | | R-squared = 0.8685 | | |
| | | | | Adj R-squared = 0.8597 | | |
| | | | | Root MSE = .04118 | | |
| absorvancia | Coef. | Std. Err. | t | P> t | [95% Conf. Interval] | |
| tiempo | .061881 | .0044936 | 13.77 | 0.000 | .0528303 | .0709316 |
| vlv2 | .06685 | .0140673 | 4.75 | 0.000 | .0385171 | .0951829 |
| w | -.0491143 | .0087597 | -5.61 | 0.000 | -.0667572 | -.0314714 |

Figura N° 28: Resultado, arrojado por el programa stata12, y los valores de los p, para cada variable, siendo estos valores significativos para todas las variables.

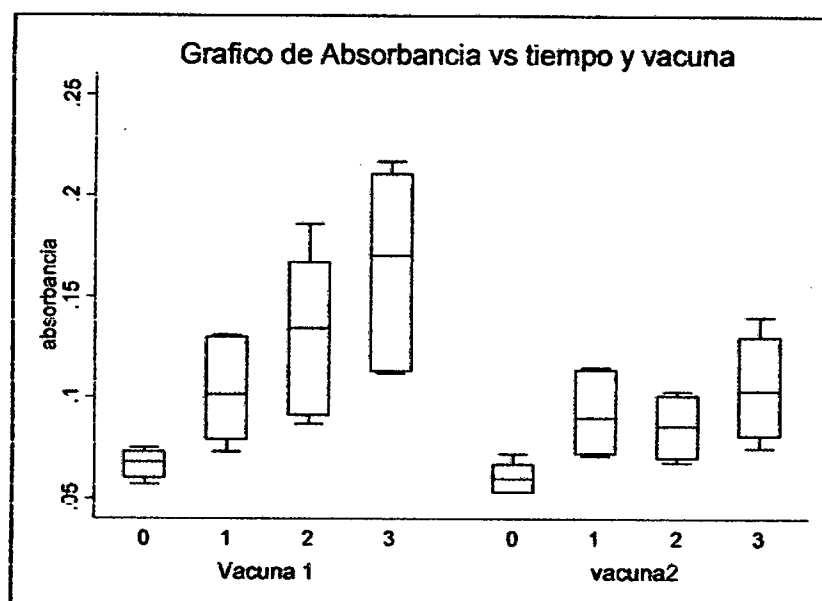


Figura N° 29: Box plot de la regresión lineal múltiple de las dos vacunas en los diferente tiempos. Vacuna 1 (Alb+Ep4), vacuna 2 (Ep4). Tiempos de sangrado, 0 (pre-inmune); 1, 2, 3 (primera, segunda y tercera Post-inmunización).

3.7.5. Cinética de la presencia de anticuerpos reactivos contra albúmina de ratón

La prueba de Kruskal –Wallis realizada para la cinética, demostró que hay por los menos una mediana de ODs de los sueros pre-inmune y post-inmunes (primera, segunda y tercera inmunización) es estadísticamente diferente ($p=0.0002$), lo que significa que hay generación de anticuerpos contra la albúmina nativa de ratón, la cual no lleva a His-tag y al epítopo de influenza. Esta diferencia se observa en el tiempo post-inmune 3 comparado con el tiempo pre-inmune. (Figura No 30). Se usaron 6 repeticiones para el análisis. Ver Anexo 17.

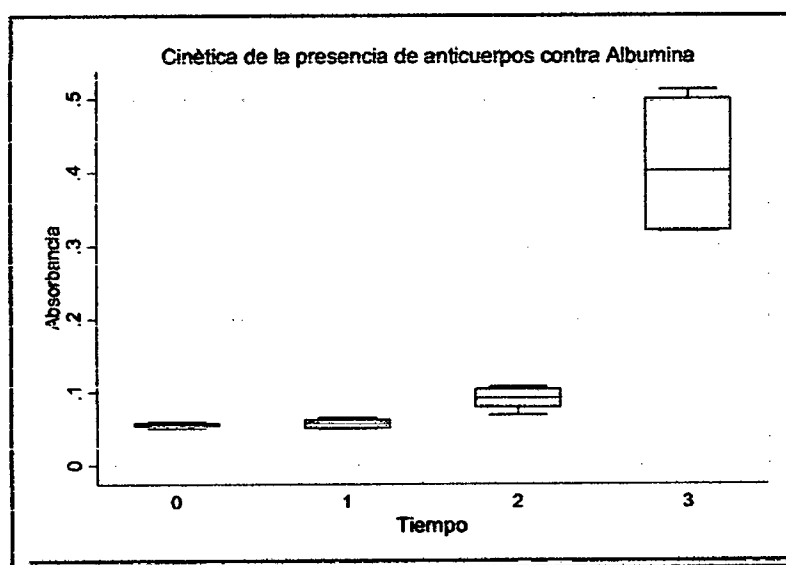


Figura N° 30: El box plot de las absorbancias en los diferentes tiempos. Tiempos de sangrado, 0 (pre-inmune); 1, 2, 3 (primera, segunda y tercera Post-inmunización).

3.7.6. Cinética de la presencia de anticuerpos contra His-tag, por la vacuna Alb+Ep4

La prueba de Kruskal –Wallis mostró que hay por los menos una mediana de los ODs diferente en los tiempos analizados, con un $p = 0.0001$, lo que significa que hay anticuerpos contra el segmento His-tag generados por la vacuna ALB+Ep4, esto demostrado al enfrentar los sueros vs otra proteína que posee el segmento His-tag (pirazidamidaza), dando ODs altos. En el tiempo post-inmune 3 se encuentra la mayor diferencia en comparación con el tiempo pre-inmune 0. Ver anexo 18.

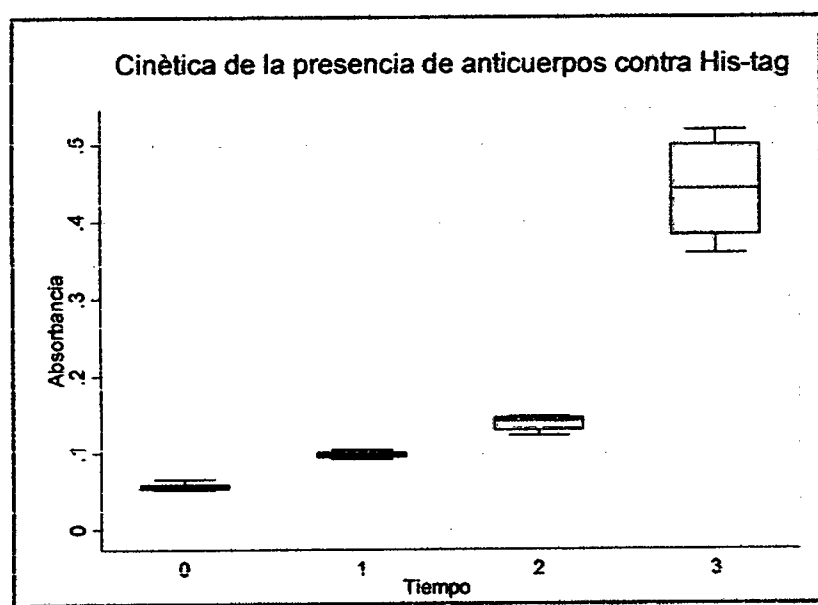


Figura N° 31: El box plot de las absorbancias en los diferentes tiempos. Tiempos de sangrado, 0 (pre-inmune); 1, 2, 3 (primera, segunda y tercera Post-inmunización).

DISCUSIÓN

La expresión de proteínas eucariotas usando el sistema *E. coli* y plásmidos; es de alta utilidad por la facilidad de obtención de grandes cantidades de proteínas. (Yee L and Blanch HW, 1992), para la expresión de ALB+Ep4 se usó el plásmido pet28A+, que proporciona enormes ventajas las cuales son: co-expresión de T7 lisozima, que permite reducir la expresión basal de un gen inducible por la T7RNA polimerasa, para evitar expresión de algún gen tóxico para la bacteria; adición de segmento His-tag para purificación, resistencia a antibióticos y diversos sitios de corte para enzimas. (Studier, 1991)(Invitrogen, 2010), se usó la cepa de *E. coli* BL21(D3)pLysS; la cual confiere las siguientes ventajas, como el uso del sistema D3 bacteriófago que posee la secuencia de T7 RNA polimerasa, que transcribirá la secuencia diana en el plásmido, también la producción de T7 lisozima por un plásmido LysS en la cepa, el cual además facilita la lisis celular y poseer la deficiencia las proteasa ompT y lon, que pueden afectar en la producción de la proteína. (Invitrogen, 2010)(Sorensen and Mortensen; 2005). La elección de este sistema fue por la facilidad que da para la expresión de proteínas recombinantes.

La expresión de proteínas también está determinado por el uso del codón de expresión; cada aminoácido es codificado por una cantidad de codones específicos y generalmente difieren entre los usados por la proteína eucariota y este sistema *E. coli*. (Khow and Suntrarachun; 2012) por eso se usan codones complementarios (Francis and Page; 2010) y la optimización del “codón usage” (Mao H, et al; 2000) para mejorar la expresión.

Usando esta tecnología junto con la optimización del “codon usage” se logró expresar la proteína ALB+Ep4 en altas concentraciones. Esto se ve referenciado en la expresión de albúmina sérica humana (HSA) y subunidades de ésta, por el uso de una cepa de *E. coli* codon plus. (Mao H, et al; 2000) en contraste con la baja producción de proteína obtenida en la expresión de Albúmina de gato (Reininger et al 2003) y perro (Pandjaitan et al; 2000) en la cual no usan la tecnología del “codón usage”. Cabe destacar que la adición de 6 histidinas en la secuencia de una proteína, que sirve para su facilitar su purificación, incrementa su expresión (Svensson et al, 2006). Esto se puede observar en la expresión de

la ALB+Ep4 en la cual se obtuvo una concentración de más de 2 mg/ml y se ve en la figura 23 (Ensayo de Bradford).

Las condiciones del tiempo de inducción, temperatura y concentraciones de inductor, para la expresión de albúmina se pueden agrupar a estas condiciones: un tiempo de 3 a 4 horas de inducción, la temperatura de 37grados centigrados y la concentración del inductor IPTG de 0.5 a 1 mM, para expresión de albúminas. (Mao H, et al; 2000) (Reininger et al 2003) (Pandjaitan et al; 2000). En este trabajo las condiciones óptimas fueron: tiempo de inducción de 4 horas a 30°C y 1mM de IPTG, (figuras 19-20), sin embargo ALB+Ep4 se expresó en todas las condiciones probadas. (Ver figura 12 a la 17). Esto debido a la optimización del “Codon usage” que facilita la traducción de la proteína.

La expresión de proteínas heterólogas en el sistema *E. coli* están asociadas a la formación de cuerpos de inclusión, esto debido a un desequilibrio entre la solubilización y la agregación de proteínas (De Groot, et al; 2008), ocasionado por la velocidad de reacción de las isomerasas y su baja eficacia para catalizar la formación de puentes disulfuro. (Rudolph et al, 1996). Otro factor es la temperatura, esta es determinante en la estabilidad y el adecuado plegamiento de las proteínas; dado que las interacciones hidrofóbicas que son dependiente de la temperatura y que se dan entre proteínas mal plegadas, permiten la agregación y de esta manera permitiendo la formación de los cuerpos de inclusión. (Khow and Suntrarachun; 2012). (Mohan S.S and Kumar P. A.; 2005). En la expresión de la proteína ALB+Ep4 se probó con varias temperaturas 23, 30 y 37gradosC, pero aun así la proteína seguía obteniéndose en cuerpos de inclusión. Esto se deba tal vez a que la ALB+Ep4 posee 17 puentes disulfuro y resulte difícil para la bacteria darle un adecuado plegamiento. Recordar que (Mao H, et al; 2000) (Reininger et al 2003) (Pandjaitan et al; 2000) también obtuvieron la albúmina mediante cuerpos de inclusión que luego solubilizaron para su extracción.

Las proteínas que forman cuerpos de inclusión son solubilizadas usando agentes caotrópicos denaturantes como la úrea, guanidina HCl, sodio dodecysulfate (Fischer and Goodenough, 1992). Dentro de estos agentes la guanidina es la más efectiva y usada (Mao et al, 2000), la úrea también es un buen agente caotropicos, pero tiene ciertas desventajas como la dependencia del pH, el cual debe determinarse para cada proteína. (Estapé D and Rinas U.; 1996). La concentración para el uso de estos agentes caotropicos es de 6-8 molar

para la úrea y 6-7 molar para la guanidina HCl para obtener el efecto de solubilización y denaturación. (Tsumoto et al, 2003). En este trabajo se usó 8 M de úrea y 20 mM de Tris-HCl a un pH 8, con el cual se logró solubilizar los cuerpos de inclusión y denaturar la proteína. Además se observó que era crítico mantener un pH 8 en la solución de úrea para su función solubilizadora y denaturadora.

La purificación mediante columnas His-tag, se basa en la afinidad de la secuencia de 6 histidinas incorporadas en la región carboxilo o amino terminal de la proteína, haciéndolas muy afines al níquel que esta acoplado a la columna, lo que permite la purificación de la proteína diana. (Amershan Biosciences, 2004). La ALB+Ep4 posee 6 histidinas en la posición carboxilo terminal, lo que permitió el uso de estas columnas para su purificación, obteniéndose una proteína pura (Ver figura 21). Las columnas His-tag soportan concentraciones altas de agentes denaturantes como 8 M de úrea, lo que permitió una sencilla purificación.

El paso siguiente para las proteínas purificadas de cuerpos de inclusión, es el replegamiento. Este proceso consiste en un cambio de conformación de su estructura desplegada (no nativa) a una compacta (nativa) (Tsumoto et al, 2002) mediante la remoción del agente denaturante en varias etapas, de manera que al final quede una proteína replegada en una solución acuosa. (Mohan and Kumar, 2004). Para el replegamiento de la ALB+Ep4 se usó una mezcla de dos métodos: dilución y diálisis. Este método fue adaptado de Burton et al, 1988, quien logró el replegamiento de HSA al 94%. Nosotros adaptamos este método para la ALB+Ep4, con el cual logramos obtener 30% de proteína replegada. Cabe destacar que el uso de 8 M de úrea, permite una buena denaturación y fácil de removimiento por diálisis; debido a que la úrea permite que el agua penetre en las proteínas, desorganizando las interacciones hidrofóbicas (Melo y Cuamatzi, 2007) y que además su gradual eliminación permite mantener denaturadas a las proteínas no plegadas y evitar la agregación. (Burton et al, 1988). Se usó también 2-mercaptoethanol, para mantener la proteína en un estado reducido y así favorecer la formación de puentes disulfuro. (Fischer et al, 1993) y el EDTA, para remover cualquier metal en la solución, que catalice la oxidación de las cisteínas. (Suriden and Kumar, 2005).

En este trabajo se observó que la ALB+Ep4 se obtuvo en monómeros de 67 kDa, visto por SDS-PAGE (figura 24) al igual que (Burton et al, 1988) al replegar HSA.

También se notó una clara pérdida de proteína debido por la precipitación y la adsorción de la proteína por la membrana. (Vallejos and Rinas, 2004).

De ALB+Ep4 replegada obtenida del proceso de diálisis, se necesitó saber ¿cuál era el porcentaje de proteína en el estado nativo? La capacidad de captura de zinc de la ALB+Ep4 y de la Albúmina nativa de ratón fue medida y fue considerada el gold estándar de comparación. Diseñamos las formulas en base a equivalencia entre las mediciones de zinc inicial con la final y la diferencia entre estos, después del ensayo. Además de poner tres variables, como la estequiometria (α), la cantidad de zinc retenida por el sistema y el porcentaje de replegamiento (β). (Ecuaciones 1 y 3).

$$[\text{Zn}] \text{ retenido} = [\text{Zn}]_o - [\text{Zn}]_f = \alpha \beta [\text{ALB}] \quad (1)$$

$$[100\% \cdot [\text{Zn}]_o - \% \text{ retención} \cdot [\text{Zn}]_o] - [\text{Zn}]_f = \alpha \beta [\text{ALB}] \quad (3)$$

Lo que encontramos fue que a una estequiometria de 1 molécula de zinc por 1 molécula ALB+Ep4, el β fue de 82%, esto al compararlo con la albúmina nativa de ratón. (Ver tabla 6). La esquiometria de uno fue usada en base a que la albúmina de bovino (BSA), perro (DSA) y rata (RSA) es capaz de unir fisiológicamente una molécula de zinc. (Giroux and Schoun; 1981); así como la albúmina de humano (HSA). (Goumakos et al; 1991) (Masuoka et al, 1993) (Lu Jin, et al; 2008) (Lu Jin et al; 2012) (Bal et al; 2013).

Otros autores mencionan que la HSA es capaz de unir dos moléculas de zinc. (André C and Guillaume Y.C; 2003). En últimos estudios se descubrió que la albúmina tiene un segundo sitio de unión a zinc, esto sucede cuando se une un ácido graso denominado FA 1 por la posición 1 y permite la unión del zinc, pero a la vez un FA2 se une en la posición dos que el sitio principal de unión (MBS) o sitio de unión multi-metal y lo distorsiona dependiendo del tamaño del ácido graso; la unión de un ácido graso en la posición 1 para estos en la albúmina es de baja afinidad y solo se da cuando hay un exceso de ácidos graso para interacción. (Fanali et al; 2012)(Lu Jin et al; 2012)(Stewart et al; 2002). Sin embargo, la albúmina nativa de ratón de procedencia comercial no posee ácidos grasos y la ALB+Ep4 es recombinante, ambas no poseen ácidos grasos. Nosotros demostramos que la albúmina de ratón es capaz de unir una molécula de zinc, a su estructura y que la ALB+Ep4 replegada también es capaz de unir una molécula de zinc, además de probar que

la adaptación del protocolo de replegamiento de HSA (Burton et al, 1988) funciona para la albúmina de ratón.

En vista de que se tenía los datos calculamos la constante de afinidad (K_a) de la ALB+Ep4 y la albúmina de ratón nativa por el zinc, usando la fórmula ya conocida de K_a . (Ver metodología 2.2.3); determinamos K_a sin corrección y con corrección del porcentaje de zinc retenido por el sistema usado. Las K_a con corrección fueron log 6.9 y log 6.4 y sin corrección log 7.29 y log 6.65, para la albúmina nativa de ratón y la ALB+Ep4 respectivamente en cada caso. Estos valores encontrados son muy similares a los reportados para otras albúminas: log 6.1 a 7.9 para HSA; log 7.3 a 7.6; para DSA log 6.0. (Bal W.; 1998)(Andre C. and Guillaume; 2004)(Lu J. et al; 2008)(Ohyoshi et al; 1999)(Blindauer et al; 2009)(Goumakos et al; 1991) (Masuoka et al, 1993)(Lu J. et al; 2012). Con lo que podemos afirmar que los valores encontrados se encuentran dentro del rango reportado para las albúminas de mamíferos. Otro factor que influye en la interacción de la albúmina con el zinc es el pH; por la competencia que se da entre los iones hidrógenos y zinc por el sitio de unión, el pH reportado con la mejor interacción es en el rango de 7.3 a 7.4. (Ohyoshi et al; 1999) (Blindauer et al; 2009)(Andre C. and Guillaume; 2004). Asimismo se hace referencia a la temperatura de interacción, que varía de 25°C a 37°C. (Giroux and Schoun; 1981) (Andre C. and Guillaume; 2004). Nosotros comprobamos que el pH de 7.3 y la temperatura de 25°C permitieron que obtuviéramos la interacción entre la albúmina y zinc en relación de 1 a 1.

En la generación de la respuesta inmune adaptativa que se da a través de la presentación de epítopes procesados de los antígenos extraños y presentados por las células presentadoras de antígenos (APC) o dendríticas, por medio del MHC tipo II, a los linfocitos T y B. Además la respuesta inmune adaptativa humoral se basa en la producción de anticuerpos por linfocitos B plasmáticos previamente activados por los antígenos y luego por los linfocitos T para que cumplan la función productora de anticuerpos. (Schwartz, R.H, 2003). Los resultados de los ensayos inmunológicos (ELISA) en los que se probó los sueros pre-inmunización y post-inmunización de los tres tipos de vacunas contra el propio antígeno usado dieron resultados esperados: la vacuna en base a la proteína ALB+Ep4 la cual fue diseñada para tener un epítope de influenza en su estructura, el cual es capaz de generar una respuesta humoral, reportado por (Yun Lu et al, 2002 y Hua Li et al, 2003). Y que además del epítope de influenza H3N2, lleva un segmento de seis histidinas, el cual sirve para la purificación por cromatografía de afinidad a Níquel; es

capaz de levantar una respuesta humoral alta en ratones como se ve en la figura 25 la diferencia entre pre-inmunización y post-inmunización; a diferencia de la casi inexistente respuesta humoral por la vacuna en base al epítotope solo, el cual se observa en la figura 27, la cual no muestra diferencia significativa entre la pre-inmunización y la post-inmunización. Ahora en vista de estos resultados se decidió comparar la capacidad de generación de una respuesta humoral específica contra el epítotope por ambas vacunas. En los ensayos experimentales se fijó el epítotope de influenza H3N2 y se enfrentó a los sueros pre y post inmunización de ambas vacunas. Obteniendo resultados no esperados, los ODs de mas de 1, detectados para la vacuna en base a ALB+EP4 bajaron a 0.2, esto quiere decir que los anticuerpos generados específicos contra el Ep4 esta ne menor porporcion que otros anticuerpos generados contra diversas partes de la ALB+EP4. Los ODs generados por la vacuna en base al EP4 siguieron siendo bajos en comparación con los generados por la vacuna ALB+EP4. (Se puede observar en la figura 29).

La pregunta generada ahora era: ¿Qué parte de la ALB+Ep4 había generado una respuesta inmune humoral tan alta? La respuesta se dio en la caracterización general de los anticuerpos por ensayos de Elisa contra antígenos seleccionados. Se probó usando una proteína recombinante diferente pero que incluyera a las seis histidinas en la misma posición que la ALB+Ep4 y a la cual los ratones no hubieran estado expuestos. La proteína elegida fue pirazinamida, a la cual se le enfrentó contra los sueros pre y post-inmune de la vacuna ALB+Ep4. Se observó que los anticuerpos eran capaz de reconocer esta proteína, que lo único similar que tiene es el segmento de seis histidinas. (Figura 31). Probando esto que una parte importante del total de la respuesta es causada por este segmento de 6 histidinas.

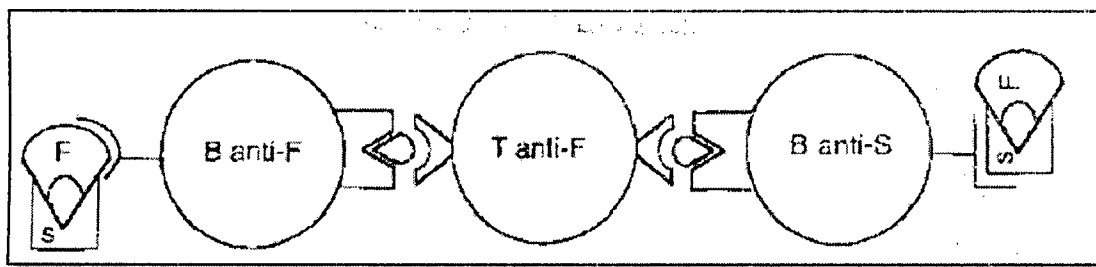
El segundo antígeno elegido fue la albúmina de ratón, ¿porque? La razón es simple, observar si se había generado una respuesta humoral autoinmune. En la figura 30 podemos observar que si se genera una respuesta contra la albúmina de ratón leve en las dos primeras inmunización pero después de la tercera inmunización esta se dispara, representado una parte importante de la respuesta humoral total.

La respuesta humoral generada por la vacuna en base ALB+Ep4, se explica de la siguiente manera: en un estudio pionero para observar el efecto del segmento de 6 histidinas usada para facilitar la purificación de proteínas recombinantes, demostró que al adicionar las 6 histidinas en la extremo C o N-terminal de una proteína, la MSP1 de

Plasmodium falciparum se observó que influía en el tipo de respuesta humoral de manera que aumentaba la generación de anticuerpos en comparación con la misma proteína sin el segmento de seis histidinas, pero estos no eran tan específicos contra la proteína MSP1, al probarlo en una prueba de inhibición de crecimiento del Plasmodium. (Khan et al , 2012).

Pero también otros estudios demuestran que las seis histidinas no tiene un efecto en la inmunogenicidad de proteínas como en el uso de antígeno HBcAg del virus de la hepatitis en la cual no afectó (Boon Yap et al, 2009) y también demostrado en la inmunogenicidad de la proteína NS1 (Ling et al, 2008). En este debate la investigación de Khan et al, 2012 da una luz al haber analizado por un predictor de epítopes usando el algoritmo de Rankpep Epítape Prediction (Reche et al , 2002), las secuencias de la proteína con el segmento de 6 histidinas y el que no poseía, observando que la clasificación de los epítopes inmunodominante cambia, generándose nuevos epítopes. En este trabajo probamos el predictor de epítopes Rankpep y observamos que la inmunodominancia había cambiado y que el epítape de influenza H3N2 pasa a un último plano, quedando como el epítape más inmunogenico un péptido, el cual estaba compuesto por seis histidinas y una pequeña porción de la proteína albúmina de ratón. Esto explicaría la respuesta alta conseguida por la ALB+Ep4, la cual está constituida por anticuerpos contra el segmento de seis histidinas y la respuesta contra la albúmina de ratón y la generación de anticuerpos no específicos.

Pero por que se ve favorecida la generación de estos anticuerpos contra el segmento de histidinas y contra la albúmina. Esto se explica por la siguiente razón. Puede que los linfocito B reactivos contra segmentos de albúmina de ratón y el segmento de seis histidinas se vea favorecidos, de manera que los BCR receptores de los linfocitos B detecten estos segmentos y al procesar la proteína ALB+Ep4 presente por el MHC tipo II el epítape de influenza, de esta manera cuando los linfocitos T cooperadores activados para reconocer el epítape de influenza H3N2, los activen y de esta manera favorecen la generación de anticuerpos contra estos segmentos. Matzinger en 1994 ya daba un alcance de esto en el límite de la tolerancia por antígenos, como se observa en la figura 32 que dos linfocitos B que detectan diferentes epítopes antigénicos en una proteína son activados por un solo linfocito T que es capaz de detectar un solo epítape, porque en el procesamiento los linfocitos B expresan el mismo epítape, aunque su BCR reconozca diferentes epítopes.



FiguraN° 32: Activación de linfocitos B que presentan mismo epítipo pero reconocen diferentes epítopes. Sacado de *Tolerance, Danger, and the Extended Family*. (Matzinger P., 1994).

Claramente esto está pasando con la generación de anticuerpos por la vacuna en base a la ALB+Ep4, una generación de anticuerpos no específicos activados por linfocitos T que reconocen un epítipo. Las posibilidades son varias como que los linfocitos T que reconocen el epítipo de influenza activen a linfocitos B que reconocen epítopes de la albúmina, contra el segmento de 6 histidinas, contra epítopes nuevos (parte de secuencia entre la albúmina y el segmento de 6 histidinas) o parte del epítipo de influenza y parte de la albúmina; pero que presenten por el MHC II el epítipo de influenza, de esta manera son activados. De esta manera la respuesta ocasionada por la ALB+Ep4 estaria sesgada para el Ep4, ya que se estaría favoreciendo la activación de otros linfocitos B reactivos contra otros epítopes ocasionado por el segmento de 6 histidinas.

La respuesta humoral no generada encontrada por la vacuna en base a la albúmina de ratón nativa, probada en estos animales, (figura 26) es lo esperado pues el organismo suele ejercer una vigilancia tolerogénica contra sus propias proteínas. Esto se explica por: la tolerancia central, dada en el timo, en el cual se da la selección negativa de los linfocitos, en la cual los timocitos son seleccionados por la capacidad de no realizar una reacción cruzada con antígenos propios por la especificidad de sus TCR, los timocitos reactantes son eliminados. (Anderson et al, 2005). Y la tolerancia periférica dada por las células T reguladoras (Linfocitos T reguladores). (Hori et al, 2003).

Con todo los resultados obtenidos y las explicaciones de porque han sucedido estas respuestas, podemos afirmar que el segmento de seis histidinas afecta en la inmogenicidad de la albúmina en este caso de la albúmina de ratón, modificando la inmunodominancia de los epítopes ,pero aun así la idea propuesta es factible al observar que la generación de anticuerpos específicos para el epítipo de influenza H3N2 que fue transplantado en la

albúmina fue mayor que la generación de anticuerpos por la vacuna en base al epítipo solo. Y para demostrar de mejor manera el modelo se debería usar una proteína ALB+Ep4 pero sin el segmento de 6 histidinas en la posición c-terminal.

CONCLUSIÓN

El epitope 4 de hemagglutinina de influenza H3N2 trasnplantado en la albumina de ratón es capaz de ser inmunogénico, generando una respuesta humoral basada en anticuerpos.

RECOMENDACIONES

- 1.- Para el caso del modelo de el epitope de influenza transplantado en la albumina de ratòn, no se debe incluir el segmento His-tag, pues su uso afecta en la Inmunodominancia del epitope transplantado y de esta manera generando una variedad de nuevos epitopes, los cuales generaran una variedad de anticuerpos no deseados.
- 2.- Si se desea obtener una albumina de ratòn soluble es preferible usar otro sistema de expresión de proteínas diferente a E. coli. Como levaduras.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, A.K. and Lichtman, A.H.(2005) Cellular and Molecular Immunology, 5th ed.Elsevier Saunders.
2. Aderem, A. and Ulevitch, J. (2000) Toll-like receptors in the induction of innate immune response. *Nature* 406, 782–787
3. Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Chen,Z., Berzins, S.P., Mathis,D. (2005). The celular mechanism of Aire control of Tcell Tolerance. *Immunity* 23, 227-239.
4. André C., Y.C. Guillaume; (2004). Zinc-Human Serum Albumin Association: Testimony of Two Binding Sites
5. Amershan Biosiences. Manual Hitrap. 71-5027-68 Edition AB.(2004).
6. Bal Wojciech, Sokolowska Magdalena, Kurowska Ewa and Faller Peter.(2013) Binding of transition metal ions to albumin:sites, affinities and rates. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830. 5444–5455
7. Bal Wojciech, Christodoulou Jhon, Sadler Peter and Tucker Alan. (1998). Multi-metal Binding site of serum albumin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 70. 33-39.
8. Balasse E., Johann Odot , Gregory Gatouillat ,Marie-Christine Andry , Claudie Madoulet. (2008).Enhanced immune response induced by BSA loaded in hydroxyethylstarch microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 353:131–138.
9. Bazin H. (2008). *L'Histoire des vaccinations*. Montrouge. France, John Libbey Eurotext.
10. Berek C, Berger A, Apel M. (1991).Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*.67(6):1121-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1760840>
11. Bio-Rad. (2012). Manual Proteins Assasy. Disponible en: http://labs.fhrc.org/fero/Protocols/BioRad_Bradford.pdf

12. Burton S, Quirk A. and Wood C. (1998). Refolding human serum albumin at relatively high protein concentration. Delta Biotechnology Limited, Nottingham.

13. Blindauer C.A., I. Harvey, K.E. Bunyan, A.J. Stewart, D. Sleep, D.J. Harrison, S. Berezenko, P.J. Sadler. (2009). Structure, properties, and engineering of the major zinc binding site on human albumin, *J. Biol. Chem.* 284:23116–23124

14. Blindauer A. C. (2013). Lessons on the critical interplay between zinc binding and protein structure and dynamics. *J. Inorg. Biochemistry* 121. 145-155.

15. Bluestone J. (1995). New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity*, Vol. 2, 555-559. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7540940>

16. Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*: 7;72:248–54. Citado en PubMed; PMID:942051. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.welch.jhmi.edu/pubmed/?term=9451>

17. Cash HL, Whitham CV, Hooper LV. (2006). Refolding, purification, and characterization of human and murine RegIII proteins expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 48(1):151–9. Citado en PubMed; PMID: 16504538. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.welch.jhmi.edu/pubmed/?term=1650458>

18. Cavanagh Lois and Ulrich H Von Andriam. (2002). Travellers in many guises: The origins and destinations of dendritic cells. *Immunology and Cell Biology* . 80, 448–462.

19. Coffman RL, Sher A, Seder RA. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*. 33(4):492-503. doi: 10.1016/j.immuni.2010.10.002. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21029960>

20. Crowther JR. (2002). The Elisa Guidebook. *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY* TM John M. Walker, Series Editor.

21. Cherryholmes G., Sasha E. Stanton, Mary L. (2015). Disis. Current methods of epitope identification for cancer vaccine design. *Vaccine*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.06.116>

22. Cox, J.C. and Coulter, A.R. (1997) Adjuvants – a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15, 248–256.
23. Chart, H., Smith, H.R., La Ragione, R.M., Woodward MJ.(2000).An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5alpha and EQ1. *J. Appl. Microbiol.* 89, 1048–1058.
24. Donayre-Torres AJ, Esquivel-Soto E, Gutiérrez-Xicoténcatl M de L, Esquivel-Guadarrama FR, Gómez-Lim MA.(2009). Production and purification of immunologically active core protein p24 from HIV-1 fused to ricin toxin B subunit in *E. coli*. *Virology Journal*:6:17. Citado en PubMed; PMID: 19196485. Disponible en : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.welch.jhmi.edu/pubmed/?term=1919645>
25. De Groot Natalia S. , Raimon Sabate, Salvador Ventura. (2009). Amyloids in bacterial inclusion bodies. *Trends in Biochemical sciences*. doi:10.1016/j.tibs.2009.03.009.
26. Du Lanying , Yusen Zhou , Shibo Jiang.(2010). Research and development of universal influenza Vaccines. *Microbes and Infection* .280-286.
27. Estapé D, Rinas U. (1996). Optimized procedures for purification and solubilization of basic fibroblast growth factor inclusion bodies. *Biotechnol Tech*: 10:481-484.
28. Fahnert B., Hauke L., and Neubauer P.(2004). Inclusion bodies: Formation and utilisation. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 89: 93–142.
29. Fasano, M., Curry, S., Terreno, E., Galliano, M., Fanali, G., Narciso, P., Notari, S. and Ascenzi, P. (2005) The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*. 57,787–796.
30. Fanali G., Y. Cao, P. Ascenzi, M. Fasano.(2012). Mn(II) binding to human serum albumin: a ¹H-NMR relaxometric study, *J. Inorg. Biochem.* 117 : 198–203
31. Fiers W., F.M. De, A. Birkett, S. Neiryck, J.W. Min.(2004). A ‘universal’ human influenza A vaccine. *Virus Res.* 103:173-176.
32. Fischer, B., Sumner, I., and Goodenough, P.(1993): Isolation, renaturation and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *E. coli* as inclusion bodies. *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 3–13.

33. Foster, J. F.(1977). In "Albumin Structure, Function and Uses" (V. M. Rosenoer, M. Oratz, and M. A. Rothschild, eds). pp. 53-84. Pergamon, Oxford.

34. Francis DM, Page R. (2010).Strategies to optimize protein expression in E. coli. Current Protocols in Protein Science. Chapter 5:Unit 5.24.1–29. Citado en PubMed; PMID: 20814932. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.welch.jhmi.edu/pubmed/?term=2081492>

35. Garg NK, Dwivedi P, Jain A, Tyagi S, Sahu T, Tyagi RK. (2014).Development of novel carrier(s) mediated tuberculosis vaccine: more than a tour de force. Eur J Pharm Sci:62:227-42. doi: 10.1016/j.ejps.2014.05.028.

36. Gabriele Neumann, Takeshi Noda, and Yoshihiro Kawaoka. (2009).Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. Nature. 459(7249): 931–939. doi:10.1038/nature08157

37. Greenwood Brian, Salisbury David and Adrian V. S. Hill. (2011).Vaccines and global health. Phil. Trans. R. Soc. B :366, 2733–2742. doi:10.1098/rstb.2011.0076.

38. Gierasch L.M., J.E. Lacy, K.F. Thompson, A.L. Rockwell, P.I. Watnick.(1982).Conformations of model peptides in membrane-mimetic environments, Biophy. J. 37 :275–284.

39. Giroux E, Schoun J. (1981).Copper and zinc ion binding by bovine, dog, and rat serum albumins. J Inorg Biochem.14(4):359-62

40. Giuliani, M.M., Adu-Bobie, J., Comanducci, M., Arico, B., Savino, S., Santini, L., Brunelli, B., Bambini, S., Biolchi, A., Capecchi, B., et al. (2006). A universal vaccine for serogroup B meningococcus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 10834–10839.

41. Goldblatt D.(2000). Conjugate Vaccines. Clin Exp Immunol 119:1–3.

42. Goldstone S. y Vuocolo s.(2012). A prophylactic quadrivalent vaccine for the prevention of infection and disease related to HPV-6, -11, -16 and -18. Expert Rev. Vaccines 11(4), 395–406.

43. Goodnow Christopher C, Jeffrey Crosbie, Stephen Adelstein, Thomas B. Lavoie, Sandra J. Smith-Gill, Robert A. Brink, Helen Pritchard-Briscoe, John S. Wotherspoon,

Robert H. Loblay, Kathy Raphael, Ronald J. Trent and Antony Basten.(1988). Pillars Article: Altered Immunoglobulin Expression and Functional Silencing of Self-Reactive B Lymphocytes in Transgenic. Mice. *Nature* . 334: 676-682.

44. Goumakos W., J.-P. Laussac, B. Sarkar.(1991). Binding of cadmium(II) and zinc(II) to human and dog serum albumins. An equilibrium dialysis and ¹¹³Cd-NMR study. *Biochem. Cell Biol.* 69 :809.
45. Georgiou G. and Pascal Valax.(1999) Isolating Inclusion Bodies from Bacteria. *Methods in Enzymology*, Vol. 309.
46. Guo Le, Runting Yin , Kunmei Liu , Xiaobo Lv , Yonghong Li , Xiangguo Duan , Yuankui Chu , Tao Xi , Yingying Xing.(2014).Immunological features and efficacy of a multi-epitope vaccine CTB-UE against *H. pylori* in BALB/c mice model. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:3495–3507.
47. Hartley DL, Kane JF.(1988). Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans.*16(2):101-2.
48. Hoa LK, Hiep LV, Be LV.(2011). Development of pandemic influenza vaccine production capacity in Viet Nam. *Vaccine. Suppl* 1:A34-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.118.
49. Hong Huang Lin, Guang Lan Zhang, Songsak Tongchusak, Ellis L Reinherz and Vladimir Brusic. (2008).Evaluation of MHC-II peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. *BMC Bioinformatics* , 9(Suppl 12):S22 doi:10.1186/1471-2105-9-S12-S22.
50. Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299,1057-1061.
51. Hua Li, Jian Ding, Ying-Hua Chen. (2003).Recombinant protein comprising multi-neutralizing epitopes induced high titer of antibodies against influenza A virus. *Immunobiology.* 207(5):305-13. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hua+Li%2C+Jian+Ding%2C+Ying-Hua+Chen,+Recombinant+protein+comprising>
52. Hunke S, Betton J-M. (2003).Temperature effect on inclusion body formation and stress response in the periplasm of *Escherichia coli*. *Molecular*

Microbiology.50(5):1579–89. Citado en PubMed; PMID: 14651640. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ezproxy.welch.jhmi.edu/pubmed/?term=1465160>

53. Iwasaki Akiko y Ruslan Medzhitov. (2004).Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. NATURE IMMUNOLOGY VOLUME 5 NUMBER 10.

54. Inaba K, Steinman RM.(1984). Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. J Exp Med.160(6):1717-35.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6239901>

55. Invitrogen. (2010).Chemically competent cells. Catalg nos. c6010-03.

Jahouh Farid, Shu-jie Hou, Pavol Kováč, and Joseph H. Banoub.(2012). Determination of glycation sites by tandem mass spectrometry in a synthetic lactose-bovine serum albumin conjugate, a vaccine model prepared by dialkyl squarate chemistry. Rapid Commun Mass Spectrom. 26(7): 749–758. doi:10.1002/rcm.6166.

56. Jin Lu, Alan J. Stewart, Peter J. Sadler, Teresa J.T.(2008). Pinheiro and Claudia A. Blindauer. Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site. Biochem. Soc. Trans. 36, 1317–1321; doi:10.1042/BST0361317.

57. Jin Lu , Alan J. Stewart, Darrell Sleep, Peter J. Sadler, Teresa J. T. Pinheiro, and Claudia A. Blindauer.(2012). A Molecular Mechanism for Modulating Plasma Zn Speciation by Fatty Acids. J. Am. Chem.Soc. 134, 1454–1457. dx.doi.org/10.1021/ja210496n.

58. Jeong KJ, Lee SY. (1999).High-level production of human leptin by fed-batch cultivation of recombinant Escherichia coli and its purification. Applied and Environmental Microbiology.65 (7):3027–32. Citado en PubMed; PMID: 10388699. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ezproxy.welch.jhmi.edu/pubmed/?term=1038869>

59. Kane, J.F.(1995).Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli. Curr. Opin. Biotechnol. 6, 494–500.

60. Kang Sang-Moo, Jae-Min Song, and Richard W. Compans. (2011).Novel vaccines against influenza viruses. Virus Res. 162(1-2): 31–38. doi:10.1016/j.virusres.2011.09.037

61. Kensil CR.(1996). Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* ;13:1–56.
62. Khoo O., Suntrarachun S. (2012).Strategies for production of active eukaryoti proteins in bacterial expression system. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.159-162.
63. Kun Yu, Nikolai Petrovsky, Christian Schönbach, Judice L.Y. Koh, and Vladimir Brusic.(2002). Methods for Prediction of Peptide Binding to MHC Molecules: A Comparative Study. *Molecular Medicine* 8(3): 137–148.
64. Kunda Nitesh K. , Iman M. Alfagih, Sarah Rachel Dennison, Hesham M. Tawfeek , Satyanarayana Somavarapu, Gillian A. Hutcheon, Imran Y. Saleem.(2014). Bovine Serum Albumin Adsorbed PGA-co-PDL Nanocarriers for Vaccine Delivery via Dry Powder Inhalation. *Pharm Res* DOI 10.1007/s11095-014-1538-5.
65. Khan Farhat , Patricia M. Legler, Ryan M. Mease, Elizabeth H. Duncan, Elke S. Bergmann-Leitner and Evelina Angov.(2012). Histidine affinity tags affect MSP1(42) structural stabilityand immunodominance in mice. *Biotechnol. J*, 7, 133–147.
66. Li Z, Wang XP, Lin HP, Xu B, Zhao Q, Qi BN, Yang YX, Wang ZR.(2015). Anti-tumor immunity elicited by cross-linking vaccine heat shock protein 72 and alpha-fetoprotein epitope peptide. *Neoplasma*.62(5):713-21. doi: 10.4149/neo_2015_085.
67. Li W, Chen Q, Chen H, Rao P, Xue X, Chen S, Zhu S, Zhang L.(2013). Immune response of mice to a latency membrane protein 2 multiepitope antigen of Epstein-Barr virus applied as DNA vaccine and/or peptide vaccine. *Acta Virol*.57(1):51-8. PMID: 23530824.
68. Lundegaard Claus, Morten Nielsen and Ole Lund.(2006). The validity of predicted T-cell epitopes.*TRENDS in Biotechnology* Vol.24 No.12.
69. Ling Zhenhua , Kim C. Tran , Jamie J. Arnold , Michael N. Teng. (2008).Purification and characterization of recombinant human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS1. *Protein Expression and Purification* 57 .261–270.
70. MacLennan, I.C.M.(1994) Germinal centres.*Annu Rev Immunol* 12, 117-139.

71. Mancini N, Laura Solforosi , Nicola Clementi, Donata De Marco, Massimo Clementi, Roberto Burioni.(2011). A potential role for monoclonal antibodies in prophylactic and therapeutic treatment of influenza. Antiviral Research. Disponible en: doi:10.1016/j.antiviral.2011.07.013.

72. Marciani D., 2003. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine. DDT, Vol8, N°20.

73. Martins E.O; T. Drakenberg. (1982).Cadmium(II), zinc(II), and copper(II) ions binding to bovine serum albumin. A 113Cd NMR study. Inorg. Chim. Acta 67 .

74. Martin F, Oliver AM, Kearney JF.(2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. Immunity.14(5):617-29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11371363>

75. Mao Hongyuan, Gunasekera A., and Fesik S.W.(2000). Expression, Refolding , and isotopic labeling of human serum albumin domains for NMR spectroscopy. Protein Expression and Purification 20, 492–499.

76. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. (2004).Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. Nature. 427(6972):355-60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14737169>

77. Matsubara K, Mizuguchi M, Kawano K.(2003). Expression of a synthetic gene encoding human transthyretin in Escherichia coli. Protein Expression and Purification.30(1):55–61. Citado en PubMed; PMID: 12821321. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.welch.jhmi.edu/pubmed/?term=1282131>

78. Masuoka J., P. Saltman,.(1994). Zinc (II) and copper(II) binding to serum albumin. a comparative study of dog, bovine, and human albumin, J. Biol. Chem. 269: 25557–25561.

79. Matzinger P.(1994). Tolerance, danger, and the extended family. Annu Rev Immunol. 12:991-1045.

80. Melo R. and Cuamartzi. (2007). Bioquímica de los procesos metabólicos. 2 Edición.

81. Miller Mark J., Sindy H. Wei, Michael D. Cahalan, and Ian Parker. (2002).Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy. Disponible en: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2628040100

82. Millipore Inc.(2008). User Guide Stirred Ultrafiltration Cells Models 8003,8010,8050,8200, 8400.

83. Mohan Surinder and Kumar Amulaya. (2005).Solubilization and Refolding of bacterial inclusion body proteins. Product Development Cell, National Institute of Immunology.

84. Moisa A, Kolesanova E.(2010). Synthetic peptide Vaccines. Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry , Issue 4, pp 321-332.

85. Moutaftsi, M., Peters, B., Pasquetto, V., Tschärke, D.C., Sidney, J., Bui, H.H., Grey, H., and Sette, A. (2006).A consensus epitope prediction approach identifies the breadth of murine T(CD8+)-cell responses to vaccinia virus. Nat. Biotechnol. 24, 817–819.

86. Morein B., Sundquist, S. Hoglund, K. Dalsgaard, A. Osterhaus,1984. Nature 305; 457-460.

87. McHugh KJ, Guarecuco R, Langer R, Jaklenec A. (2015).Single-injection vaccines: Progress, challenges, and opportunities. J Control Release. pii: S0168-3659(15)30040-7. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.07.029. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.1016%2Fj.jconrel.2015.07.09>

88. McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ et al (1984) Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. Nature 307:178–180.

89. Nayak Debi P., Rilwan A. Balogun, Hiroshi Yamada, Z. Hong Zhou1, and Subrata Barman.(2009). Influenza virus morphogenesis and budding. Virus Res. 143(2): 147–161. doi:10.1016/j.virusres.2009.05.010.

90. New England Biolabs Inc.(2012). High Efficiency Transformation Protocol for Competent E. coli.Disponible en: <https://www.neb.com/protocols/2012/05/24/high-efficiency-transformation-protocol>

91. New England Biolabs Inc.(2012). Guías de uso de las enzimas de restricción de XhoI y NcoI.Disponible en: <https://www.neb.com/products/r0146-xhoi> ;
<https://www.neb.com/products/r0193-ncoi>

92. Organización mundial de la salud, 2015. Disponible en:
www.who.int/topics/vaccines/es/

93. Ohyoshi E., Yoshito Hamada, Kana Nakata, Susumu Kohata . 1999.The interaction between human and bovine serum albumin and zinc studied by a competitive spectrophotometry. Journal of Inorganic Biochemistry 75 . 213–218

94. Osterholm MT, Kelly NS, Manske JM, Ballering KS, Leighton TR, Moore KA (2012) The compelling need for game-changing influenza vaccines: an analysis of the influenza vaccine enterprise and recommendations for the future. University of Minnesota Center for Infectious Disease Research and Policy.

95. Ouellette T, Destrau S, Ouellette T, Zhu J, Roach JM, Coffman JD, et al.(2003). Production and purification of refolded recombinant human IL-7 from inclusion bodies. Protein Expression and Purification. 30(2):156–66. Citado en PubMed; PMID: 12880763. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.welch.jhmi.edu/pubmed/?term=1288073>

96. Pandjaitan B, Swoboda I, Brandejsky-Pichler F, Rumpold H, Valenta R, Spitzauer .(2000). Escherichia coli expression and purification of recombinant dog albumin, a cross-reactive animal allergen. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 105 (2 Pt1):279–85.Citado en PubMed; PMID: 10669848. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.welch.jhmi.edu/pubmed/?term=1066988>

97. Peyrin E., Y.C. Guillaume, C. Guinchard. (1997).Interactions between dansyl amino acids and human serum albumin using high-performance liquid chromatography: mobile-phase pH and temperature considerations. Anal. Chem. 69 :4979.

98. Pena L, Sutton T, Chockalingam A, Kumar S, Angel M, Shao H, Chen H, Li W, Perez DR.(2013). Influenza viruses with rearranged genomes as live-attenuated vaccines. J Virol.; 87(9):5118-27. doi: 10.1128/JVI.02490-12.

99. Peti, W. and Page, R. (2007).Strategies to maximize heterologous protein expression in Escherichia coli with minimal cost. Protein Expr. Purif. 51:1-10.

100. P
eters Bjoern, Huynh-Hoa Bui, Sune Frankild, Morten Nielsen, Claus Lundegaard, Emrah Kostem, Derek Basch, Kasper Lamberth, Mikkel Harndahl, Ward Fleri, Stephen S. Wilson, John Sidney, Ole Lund, Soren Buus, Alessandro Sette.(2006). A Community Resource Benchmarking Predictions of Peptide Binding to MHC-I Molecules. PLoS Comput Biol 2(6): e65. DOI: 10.1371/journal.pcbi.0020065.
101. P
uledran Bali.(2004). Modulating Th1/Th2 Responses With Microbes, Dendritic Cells, and Pathogen Recognition Receptors. Immunologic Research ;29/1–3:187–196.
102. P
ol Jonathan, Norma Bloy, Aitziber Buqué, Alexander Eggermont, Isabelle Cremer, Catherine Sautès- Fridman, Jérôme Galon, Eric Tartour, Laurence Zitvogel, Guido Kroemer and Lorenzo Galluzzi . (2015)Trial Watch: Peptide-based. anticancer vaccines, OncoImmunology, DOI: 10.4161/2162402X.2014.974411
103. P
lotkin Stanley A. , Orenstein Walter, and Paul A. (2012).Vaccines. 6th Edition.
104. P
ress, J.B. et al. (2000) Structure/function relationships of immunostimulating saponins. Stud. Nat. Prod. Chem. 24, 131–174
105. R
appuoli R.(2000). Reverse vaccinology. Current Opinion in Microbiology 3:445–450.
106. R
AJPUT Zahid Iqbal, HU Song-hua, XIAO Chen-wen, ARIJO Abdullah G.(2007). Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. Rajput et al. / J Zhejiang Univ Sci B 8(3):153-161.
107. R
eche,P.A., Glutting, J.P., Reinherz, E. L.(2002). Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs. Hum. Immunol. , 63, 701–709.
108. R
emington JP, Woods HC.(1918). The Dispensary of the United States of America. The Southwest School of Botanical Medicine, USA.

109. R
 eininger R, Swoboda I, Bohle B, Hauswirth AW, Valent P, Rumpold H, Valenta R, Spitzauer S. (2003). Characterization of recombinant cat albumin. Clin Exp Allergy. 33(12):1695-702.

110. R
 onnberg B., M. Fekadu, S. Behboudi, L. Kenne, B. Morein, 1997. Effects of carbohydrate modification of Quillaja saponaria Molina QH-B fraction on adjuvant activity, cholesterol-binding capacity and toxicity. Vaccine 15, 1820–1826.

111. R
 udolph, R. and Lilie, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. FASEB J., 10, 49–56.

112. S
 ambrook. J., Fritsch. E.F. and Maniatis. T. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1, 2 y 3rd edn. Cold Sp& Harbor Press. Cold Spring Harbor. NY.

113. S
 alk J. E, Menke W. Francis Thomas. (1945). A clinical, epidemiological and immunological evaluation of vaccination against epidemic influenza. Am. J. Epidemiol. 42 (1): 57-93. <http://aje.oxfordjournals.org/content/42/1/57.extract#>

114. S
 atthaporn, S. and Eremin, O. (2001) Dendritic cells (I): biological functions. J. R. Coll. Surg. Edinb. 46, 9–20

115. S
 tahl, P.D. and Ezekowitz, R.A. (1998) The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. Curr. Opin. Immunol. 10, 50–55.

116. S
 haoheng Chen, Dan Zheng, Changgui Li, Wenjie Zhang, Wenting Xu, Xueying Liu, Fang Fang, and Ze Chen. (2015). Protection against Multiple Subtypes of Influenza Viruses by Virus-Like Particle Vaccines Based on a Hemagglutinin Conserved Epitope. BioMed Research International, Article ID 901817, 12 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/901817>

117. S
esardic D.(1993). Synthetic peptide vaccines. J Med Microbiol.39(4):241-Disponible
en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7692052>.
118. S
ørensen HP, Mortensen KK.(2005). Advanced genetic strategies for recombinant
protein expression in Escherichia coli. Journal of Biotechnology. 26;115(2):113–28.
Citado en PubMed; PMID: 15607230. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ezproxy.welch.jhmi.edu/pubmed/?term=1560720>
119. S
un H.X., F.Qun, Y.P,Yi;2005. Vaccine
120. S
ugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M. and Kobayashi, K. (1999) Crystal
structure of human serum albumin at 2.5 angstrom resolution. Protein Eng. 12, 439–
446
121. S
kene C.D, Sutton P.2006. Saponin-adyuvanted particulate Vaccine for clinical use.
Methods40;53-59.
122. S
chwartz RH. (2003).T cell anergy. Annu Rev Immunol.21:305-34. Epub 2001 Dec 19.
123. S
mith D.J., Logan D Morton and Bret D Ulery.(2015). Nanoparticles as synthetic
Vaccines. Current Opinion in Biotechnology , 34:217–224.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.014>
124. S
chweitzer A. Nicola and Sharpe Arlene H.(1998). Studies Using Antigen-Presenting
Cells Lacking Expression of Both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) Show Distinct
Requirements for B7 Molecules During Priming Versus Restimulation of Th2 But Not
Th1 Cytokine Production. J Immunol ; 161:2762-2771;
<http://www.jimmunol.org/content/161/6/2762>.
125. S
haw Andrey S. and Dustin Michael L.(1997) Making the T Cell Receptor Go the
Distance: Review A Topological View of T Cell Activation. Immunity, Vol. 6, 361–369.

126. S
Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R.(1998). Humoral immunity due to long-lived plasma cells. Immunity. 8(3):363-72.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529153>
127. S
Stewart, A.J., Blindauer, C.A., Berezenko, S., Sleep, D. and Sadler, P.J.(2003) Interdomain zinc site on human albumin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 3701–3706
128. S
Studier W.F. and Moffatt B. (1986).Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. J. Mol. Biol. 189, 113-130.
129. S
Studier FW. (1991)Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. J Mol Biol. 5;219(1):37-44.
130. S
Structural Genomics Consortium; China Structural Genomics Consortium; Northeast Structural Genomics Consortium, Gräslund S, Nordlund P, Weigelt J, Hallberg BM, Bray J, Gileadi O, Knapp S, Oppermann U, Arrowsmith C, Hui R, Ming J, Paganon S, Park HW, Savchenko A, Yee A, Edwards A, Vincentelli R, Cambillau C, Kim R, Kim SH, Rao Z, Shi Y, Terwilliger TC, Kim CY, Hung LW, Waldo GS, Peleg Y, Albeck S, Unger T, Dym O, Prilusky J, Sussman JL, Stevens RC, Lesley SA, Wilson IA, Joachimiak A, Collart F, Dementieva I, Donnelly MI, Eschenfeldt WH, Kim Y, Stols L, Wu R, Zhou M, Burley SK, Emtage JS, Sauder JM, Thompson D, Bain K, Luz J, Gheyi T, Zhang F, Atwell S, Almo SC, Bonanno JB, Fiser A, Swaminathan S, Studier FW, Chance MR, Sali A, Acton TB, Xiao R, Zhao L, Ma LC, Hunt JF, Tong L, Cunningham K, Inouye M, Anderson S, Janjua H, Shastry R, Ho CK, Wang D, Wang H, Jiang M, Montelione GT, Stuart DI, Owens RJ, Daenke S, Schütz A, Heinemann U, Yokoyama S, Büsow K, Gunsalus KC. (2008).Protein production and purification. Nat Methods :135-46. Doi: 10.1038/nmeth.f.202. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18235434>
131. S
Jensson Johan, Christer Andersson , Janne E. Reseland , Petter Lyngstadaas ,Leif Bülow.(2006). Histidine tag fusion increases expression levels of active recombinant amelogenin in Escherichia coli. Protein Expression and Purification 48 . 134–141.

132. T
urner, P., Holst, O., and Karlsson, E.N.(2005). Optimized expression of soluble cyclomaltodextrinase of thermophilic origin in Escherichia coli by using a soluble fusion-tag and by tuning of inducer concentration. Protein Expr. Purif. 39:54- 60.
133. T
thomas S, Luxon BA.(2013). Vaccines based on structure-based design provide protection against infectious diseases. Expert Rev Vaccines:1301-11. Doi: 10.1586/14760584.2013.840092.Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24090172>
134. T
ron F. (1994).Modern Vaccinology: Hepatitis B Virus Recombinant Vaccines: Achievement and Progress. Springer Science+Business Media New York.
135.
Torres Oscar B. ,Rashmi Jalah, Kenner C. Rice, Fuying Li, Joshua F. G. Antoline, Malliga R. Iyer, Arthur E. Jacobson, Mohamed Nazim Boutaghou, Carl R. Alving, Gary R. Matyas. (2014) . Characterization and optimization of heroin hapten-BSA conjugates: method development for the synthesis of reproducible hapten-based Vaccines. Anal Bioanal Chem .406:5927–5937. DOI 10.1007/s00216-014-8035-x.
136. T
sumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T.(2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. Protein Expression and Purification.;28(1):1–8. Citado en PubMed; PMID: 12651100. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.welch.jhmi.edu/pubmed/?term=1265110>
137. V
ogel F.R.(1995). Immunologic Adjuvants for Modern Vaccine Formulations.
138. V
allejo LF, Rinas U.(2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. Microbial Cell Factories 3(1):11.Citado en PubMed; PMID: 15345063. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.welch.jhmi.edu/pubmed/?term=1534503>

139. W
ang P, Sidney J, Dow C, Mothe´ B, Sette A, et al. (2008).A Systematic Assessment of
MHC Class II Peptide Binding Predictions and Evaluation of a Consensus Approach.
PLoS Comput Biol 4(4): e1000048. doi:10.1371/journal.pcbi.1000048.
140. W
ang TT, Tan GS, Hai R, Pica N, Ngai L, Ekiert DC, Wilson IA, García-Sastre A, Moran
TM, Palese P.(2010). Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus
hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. Proc Natl Acad Sci
U S A.107(44):18979-84. doi: 10.1073/pnas.1013387107.
141. W
aite D.C. , E.W, Jacobson, F.A.Enns, R.Edelman, B.White, R.Krammer, C.Anderson,
C.R.Kensil, 2001. Vaccine;3957-3967.
142. W
ilson IA, Skehel JJ, Wiley DC (1981) Structure of the haemagglutinin membrane
glycoprotein of influenza virus at 3 A resolution. Nature 289:366373
143. X
iao Y, Zhao YX, Lu Y and Chen YH.(2000). Epitopevaccine induced high levels of
ELDKWA-epitopespecific neutralizing antibody. Immunol. Invest. 29: 41- 50.
144. X
iao Chenwen , Zahid Iqbal Rajput, Songhua Hu.2007. Improvement of a commercial
foot-and-mouth disease vaccine by supplement of Quil A. Vaccine 25 , 4795–4800.
145. X
iumin Ma, Hui Zhao, Fengbo Zhang, Yuejie Zhu, Shanshan Peng, Haimei Ma, Chunbao
Cao, Yan Xin, Delixiati Yimiti, Hao Wena and Jianbing Ding. (2015).Activity in mice of
recombinant BCG-EgG1Y162 vaccine for Echinococcus granulosus infection. Human
Vaccines & Immunotherapeutics Rev.
146. Y
. Adar, Y. Singer, R. Levi, E. Tzehoval, S. Perk, C. Banet-Noach, S. Nagar, R. Arnon, T.
Ben-Yedidia.(2009).A universal epitope-based influenza vaccine and its efficacy
against H5N1. Vaccine 27 :2099-2107.

147. Y
ap,W. B.,Tey, B.T., Ng, M.Y., Ong, S.T.,Tan,W. S.(2009).N-terminally His-tagged hepatitis B core antigens: Construction, expression, purification and antigenicity. J. Virol. Methods, 160, 125–131.
148. Y
ee L, Blanch HW.(1992). Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of Escherichia coli. Biotechnology (N Y).10(12):1550-6.
149. Y
un Hu, Hong Zheng, Wei Huang, and Chenming Zhang.(2014). A novel and efficient nicotine vaccine using nano-lipoplex as a delivery vehicle. Human Vaccines & Immunotherapeutics 10:1, 64–72.
150. Y
un Lu Jian Ding Wanli Liu Ying-Hua Chen.(2002). A Candidate Vaccine against Influenza Virus Intensively Improved the Immunogenicity of a Neutralizing Epitope. Int Arch Allergy Immunol ;127:245–250.
151. Z
hang N, Zheng BJ, Lu L3, Zhou Y, Jiang S5, Du L.(2015). Advancements in the development of subunit influenza vaccines. Microbes Infect.17(2):123-34. doi:10.1016/j.micinf.2014.12.006.
152. Z
hao Qinfu , Qiang Zhang, Yang Yue , Jiahao Huang , Donghua Di , Yikun Gao ,Xinyi Shao , Siling Wang. Investigation of 3D ordered macroporous carbon with different polymer coatings and their application as an oral vaccine carrier. International Journal of Pharmaceutics 487 (2015) 234–241. Zugen Chen, Inmin Wu, Mark L. Richter and Peter Gegenheimer.(1992). Over-expression and refolding of subunit from the chloroplast ATP synthase. Elsevier Volume 298, number 1, 69-73.
153. Z
hang Qiang , Qinfu Zhao , Ying Zhang , Ning Han a, Liang Hu , Chen Zhang , Tongying Jiang ,Siling Wang.(2014). Investigation of 3-D ordered materials with a high adsorption capacity for BSA and their potential application as an oral vaccine adjuvant. Journal of Colloid and Interface Science 434:113–121.

ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de transformación:

1. Tomar 2 ul del plásmido con el inserto y agregar con las células bacterianas.
2. Incubar por 30 minutos en hielo.
3. Incubar a 42 grados centígrados por 45 segundos.
4. Incubar por 2 minutos en hielo.
5. Agregar 0.5 ml de caldo soc a los viales con las células y el plásmido insertado e incubar por 37°C en agitación constante.
6. Centrifugar por 5 minutos a 6000 rpm (revoluciones por minuto)
7. Descartar el sobrenadante y agregar 100 micro litros de caldo LB.
8. Sembrar en una placa con agar LB más kanamicina (40ug/ml) e incubar a 37 grados centígrados por 18 horas.

Anexo 2: Protocolo de extracción de plásmido –High Plasmid Isolation Kit (Roche):

Para la extracción de plásmido usando el kit, previamente se cultivara en medio LB una colonia que ha crecido en medio placa agar más kanamicina; durante 16 horas a 37°C en un Shaker.

1. se colocara Binding Buffer en hielo.

2. preparación del material para comenzar:

Se centrifugara a 6000 rpm por 10 minutos, se descartara el sobrenadante y se quedara con el pellet, adicionar 250 ul de la suspensión Buffer + RNase en un tubo de la centrifuga que contiene el pellet; resuspender el pellet con la solución Mix.

3. luego de haber realizado la resuspención del pellet:

Adicionar 250 ul de Lisis Buffer; mixiar bien invirtiendo el tubo de 3 a 6 veces. (En caso de DNA, no vortexear). Incubar por 5 minutos a una temperatura entre 15°C y 25°C. (No incubar más de 5 minutos).

4. la verdadera lisis de la solución:

Adicionar 350 ul Binding Buffer, mixiar bien e invertir los tubos de 3 a 6 minutos. Incubar en hielo por 5 minutos y luego centrifugar a 13000 gravedades por 10 minutos.

5. Después de la centrifugación:

Insertar un High puro filtro tubo dentro del tubo de colección; transferir el sobrenadante del syep5 dentro y arriba del reservorio del buffer del tubo filtro.

Insertar el High puro tubo ensamblado dentro de la microcentrifuga y centrifugar por 1 minuto a full velocidad.

6. Después de centrifugar:

Remover el filtro tubo del tubo de colección, descartar el líquido y vuelva a insertar el filtro tubo en el tubo de colección.

7. El lavado de las células:

Adicionar 700 ul de wash buffer II dentro del reservorio de filtro tubo y centrifugar por 30 a 60 segundos a full velocidad y descartar el líquido.

8. Después de descartar el líquido. Centrifugar entero el tubo de high pure tube ensamblado por 1 minuto. Descartar el tubo de colección.

9. El eluido del DNA:

Insertar un filtre tubo limpio y estéril de 1.5 ml en un tubo de centrifuga.

Adicionar 100 ul de la elución buffer. (50 ul de EB) y centrifugar el tubo ensamblado por 1 minuto a toda velocidad.

10. El tubo de microcentrifuga nuevo cuenta con el plásmido DNA y se colocara a 25°C.

Anexo 3: Protocolo de digestión de plásmido (simple y doble):

- Digestión simple:

1. Se realizó las reacciones en un tubo de pcr, para un volumen de 20 ul (microlitros).
2. Combinar: 9 ul de agua de pcr, 2 ul de BSA 10x, 1 ul de enzima XHOI, 2 ul de buffer 4 a 10x de concentración, 6 ul de plásmido.
3. Incubar a 37°C por 3 horas.

- Digestión doble:

1. Se realizó las reacciones en un tubo de pcr, para un volumen de 20 ul (microlitros).
2. Combinar: 9 ul de agua de pcr, 2 ul de BSA 10x, 0.5 ul de enzima XHOI, 0.5 ul de enzima NCOI, 2 ul de buffer 2 a 10x de concentración, 6 ul de plásmido.
3. Incubar a 37°C por 3 horas.

Anexo 4: Protocolo de electroforesis de ADN:

1. Preparar un gel de agarosa al 1 %, disuelto en buffer TAEX al 1x.
2. Dejar gelificar por 30 minutos.
3. Se cargaran las muestras y el marcador de 1kb.
4. Correr a 95 voltios por una hora, en un buffer TAEX a 1 x de concentración.
5. Preparación de las muestras: 4 ul de agua de pcr, 1 ul de simple 6x y 1 ul de muestra de la digestión.
6. Revelación del gel: colocar el gel en una solución de bromuro de etilio por 10 minutos.
7. Lavar con agua destilada por 10 minutos.
8. Pasar el gel al transiluminador uv, observar y tomar registro.

Anexo 5: Protocolo de expresión de proteínas:

1. Seleccionar una colonia de la placa de siembra, y pasarla a un tubo de 10ml con caldo lb con kanamicina (40ug/ml).
2. Incubar el tubo en agitación por 18 horas a 37 grados centígrados.
3. Pasar el contenido del tubo a un matraz de 250 ml de caldo lb más kanamicina (40ug/ml).
4. Incubar a 37 grados centígrados, hasta que tenga una densidad óptica de 0.7 a 600nm.
5. Agregar el inductor IPTG (Isopropil-B-Trio-d-galactoperanosa) a 0,5 mM, 1mM. (dependiendo de la estandarización).
6. Incubar a diferentes temperaturas y por diferentes tiempos. (proceso de estandarización).
7. Centrifugar el medio a 6000 rpm por 15 minutos a 4 grados centígrados.
8. Votar el sobrenadante y resuspender el pellet con 10 ml de Binding Buffer (20mM Buffer fosfato, 0.5 M NaCl, Imidazol 20 mM; pH 7.4) y guardar a -70 grados centígrados las células.

Anexo 6: Protocolo de lisis celular:

1. Realizar un shock térmico: sacar el resuspendido celular y descongelarlo a 37 grados centígrados y volverlo a congelar a -70 grados centígrados. (realizar el proceso 3 veces).
2. Realizar proceso de sonicación: con el resuspendido descongelado. Sonificarlo usando el siguiente programa: el cual es de (1 seg. Activo/ 1 seg. Inactivo), un total de 60 ciclos tanto activos e inactivos.
3. Repetir el proceso por lo menos 3 veces, con un tiempo de espera entre cada vez de 5 minutos.

Anexo 7: Protocolo de obtención de proteína soluble e insoluble de la expresión:

1. Obtención de proteína soluble: la suspensión del sonicado, centrifugar a 12500 rpm por 15 minutos a 4 grados centígrados, tomar el sobrenadante y guardarlo a -20 grados centígrados.
2. Obtención de la proteína insoluble: el pellet de la centrifugación del suspendido de sonicado, resuspender en 10 ml de buffer A con 8 molar de úrea (20mM tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5Mm Imidazol, pH 8).
3. Centrifugar a 12500 rpm por 15 minutos a 4 grados centígrados.
4. Recolectar el sobrenadante y guardar a -20 grados centígrados.

Anexo 8: Protocolo de electroforesis de proteínas (SDS-PAGE):

1. Recolectar 1 ml (mililitro) de cada proceso de expresión, lisis, y obtención de proteína soluble e insoluble.
2. Las muestras del proceso de expresión: antes y después de inducir con IPTG, se centrifugara 1 ml a 14500 rpm por 5 minutos.
3. Se votara el sobrenadante, el pellet se resuspondera con 50 ul de buffer 20 mM tris-HCl.
4. Agregar la misma cantidad de simple 2x para proteínas.
5. Calentar a 95 grados centígrados por 7 minutos.

6. Las muestras de lisado, y obtención de proteínas soluble e insoluble, se tomara 20 ul y agregar 20 ul de sample 2x de proteínas, calentar a 95 grados por 7 minutos.
7. Corrida en el gel de mix acrilamida: cargar 15 ul de cada muestra en el gel de poliacrilamida al 12%, y un marcador SDS-broad range.
8. Correr en dos fases: primera fase a 10 miliamperios, hasta que la proteína se alineé. la segunda fase: correr a 30 miliamperios para la separación de proteínas.
9. Terminada la electroforesis: sacara el gel y teñirlo con una solución de 0.25% de comassie blue r250. Calentarlo por 45 segundos 3 veces en un microondas.
10. Luego decolorar el gel con una solución decolorante basada en metanol, ácido acético y agua. Calentar 3 veces por 45 segundos.

Anexo 9: Protocolo de purificación de proteínas: cromatografía de afinidad por níquel.

- Preparación de las soluciones stock:

Preparar una solución 8x Buffer fosfato pH 7.4 (160mM buffer phosphate, 4 M NaCl; pH 7.4).

▪ Tabla Anexo N°1: Buffer de purificación.

| 8x Buffer fosfato básico pH 7.4 (160mM buffer fosfato, 4 M NaCl) | | 8x Buffer fosfato ácido (160mM buffer fosfato, 4 M NaCl) | |
|---|------------------|---|------------------|
| Compuesto | Cantidad: 1Litro | Compuesto | Cantidad: 1Litro |
| Na ₂ HPO ₄ | 22.72 g | NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O | 2.20 g |
| NaCl | 233.76 g | NaCl | 23.37 g |

Preparar la solución usando agua miliq. Como diluyente.

Para regular el pH de 8x buffer fosfato acido, se usó HCl al 37%,

Para el pH del 8x buffer fosfato básico, si el pH es mayor de 7.4 se bajó el pH con la solución ácida (8x buffer fosfato acido).

Preparación de la solución de 2 Molar de Imidazol:

1. Pesar 13.62 gramos de Imidazol y disolver en 60 ml de agua destilada.
2. Ajustar el pH con HCl al 37% hasta un pH de 7.4
3. Enrasar a 100 ml.

- **Preparación de las soluciones de purificación:**

Preparar los buffer o soluciones tampón de acuerdo a las tablas:

La composición de los buffers será: 20mM Buffer fosfato, 0.5 M NaCl, con diferentes concentraciones de Imidazol en mM.

▪ **Tabla Anexo N°2: Buffer para la purificación para una proteína soluble.**

| Tipo de Buffer | Cantidad de volumen a preparar | |
|---|--------------------------------|---------------------|
| | 250ml | |
| Concentración de imidazol en buffer fosfato | 8x fosfato pH 7.4 | 2 M imidazol pH 7.4 |
| 20 mM de Imidazol | 31.25 | 2.50 |
| 40 mM de Imidazol | 31.25 | 5.00 |
| 60 mM de Imidazol | 31.25 | 7.50 |
| 100 mM de Imidazol | 31.25 | 12.50 |
| 300 mM de Imidazol | 31.25 | 37.50 |
| 500 mM de Imidazol | 31.25 | 62.50 |

1. De acuerdo a la tabla: agregar las cantidades y luego enrasar a 250 ml con agua miliq.
2. Filtrar las soluciones con una membrana 44.5 mm YM-10.

- **Soluciones para purificación de proteína insoluble:**

La única diferencia es que estos buffers llevan una concentración de 8 molar de úrea.

▪ **Tabla Anexo N°3: Buffer para la purificación para una proteína No soluble.**

| Tipo de Buffer | Cantidad de volumen a preparar | | |
|---|--------------------------------------|--|--|
| | 250ml | | Úrea |
| Concentración de imidazol en buffer fosfato | 8x fosfato pH 7.4 cantidad(ml) | 2 M imidazol pH 7.4 cantidad(ml) | Concentracion 8 Molar Cantidad(gr) |
| 20 mM de Imidazol | 31.25 | 2.50 | 120 |
| 40 mM de Imidazol | 31.25 | 5.00 | 120 |
| 60 mM de Imidazol | 31.25 | 7.50 | 120 |
| 100 mM de Imidazol | 31.25 | 12.50 | 120 |
| 300 mM de Imidazol | 31.25 | 37.50 | 120 |
| 500 mM de Imidazol | 31.25 | 62.50 | 120 |

1. Diluir la cantidad de úrea en 150 ml de agua miliq.
2. Agregar las soluciones según la tabla, para la concentración correspondiente.
3. Medir el pH y ajustarlo hasta 7.4.
4. Enrasar a 250 ml con agua miliq.

- **Proceso de purificación:**

Una vez dada las condiciones a los equipos de purificación y teniendo los buffers preparados y la columna colocada se procedió a realizar la cromatografía de afinidad.

1. Se equilibrara la columna pasando 50 ml de Binding Buffer (Buffer fosfato 20 mM, NaCl 0.5 M, 20 mM Imidazol, pH 7.4) luego se pasó 50 ml tampón fosfato 20 mM , NaCl 0.5 M, 500 mM Imidazol, y otra vez se pasó 50 ml de Binding Buffer.

2. Se pasó el sobrenadante (Fracción soluble), o la proteína solubilizada (Fracción Insoluble). De acuerdo a lo que correspondio la purificación.

Recordar no sobrepasar la capacidad de la columna, la cual es de 12 mg de proteína por ml de resina.

3. Una vez pasada nuestra proteína, se lavó la columna con Binding Buffer, hasta que el pico baje y la señal del espectrofotómetro sea constante.

4. Se lavó la columna con tampón fosfato 20 mM, NaCl 0.5 M, 40 mM Imidazol, pH 7.4; hasta que el pico baje y la señal del espectrofotómetro sea constante, de la misma manera se realizara con los demás buffer fosfato, en el siguiente orden:

Tampón fosfato 20 mM, NaCl 0.5 M, 60 mM Imidazol, pH 7.4

Tampón fosfato 20 mM, NaCl 0.5 M, 100 mM Imidazol pH 7.4

- Stripping y lavado de la columna de purificación:

1. Colocar la columna en un soporte. Pasar 50 ml de buffer Stripping (20mM buffer fosfato, 0.5mM NaCl, 0.05M EDTA, pH 7.4).
2. Pasar 25 ml de NaOH a una concentración de 1 molar y dejar reposar de 2 a 24 horas. (columna debe estar cerrada).
3. Pasar 50 ml de agua miliq.
4. Pasar 50 ml de buffer fosfato salino. (PBS)
5. Pasar 50 ml de agua miliq.
6. Pasar 2.5 ml de NiSO₄ al 0.1 Molar.
7. Pasar 50 ml de agua miliq.
8. Pasar 50 ml de Binding buffer (20 Mm buffer fosfato, NaCl 0.5 M, 20 mM Imidazol, pH 7.4).
9. Guardar la columna a -4 grados centígrados.

Anexo 10: Protocolo de concentración de proteínas:

Se describe la forma de concentración tanto para proteínas solubles e insolubles.

- Proteína soluble:**

Se usa el Binding buffer sin Imidazol para concentrar y lavar.

- Proteína insoluble**

Se usa el buffer (20 Mm Tris-HCl, 8 M úrea, pH 7.4) para concentrar y lavar.

- Proceso de concentración:

1. Lavar el sistema de Amicon y la membrana a usar, en agua miliq a 90 grados centígrados, 3 veces.
2. Esperar que enfrié, verter los tubos con proteína de la purificación hasta su capacidad, tapar el sistema e instalarlo.
3. Concentrar a una presión no mayor de 50 psi. Y hasta 10 ml. Si se tiene más volumen de proteína, repetir el proceso.
4. Una vez concentrada toda la proteína a un volumen de 10 ml, lavar con 150 ml del buffer elegido para lavado.
5. Concentrar hasta un volumen de 4 ml.
6. Centrifugar el concentrado a 10000 rpm por 3 minutos. Para sacar impurezas.
7. Guardar a -20 grados centígrados.

Anexo 11: Protocolo de cuantificación de proteínas:

1. Preparar la curva de calibración usando BSA (Albúmina Sérica de Bovino).

Se pesó 100 mg de BSA y se disolvió en agua miliq, hasta un volumen de 10 ml, para tener un stock de 10 mg/ml, del cual se realizó una dilución 1 en 10 (100 ul + 900 ul de agua miliq). Se preparó la curva de concentraciones de los estándares de acuerdo a la tabla.

▪ **Tabla Anexo N°4: Preparación de los estándares de BSA.**

| Estándar BSA (ul) | H2O MQ (ul) | Concentración final (ug/ml) |
|-------------------|-------------|-----------------------------|
| 2.5 | 497.5 | 5 |
| 5 | 495 | 10 |
| 10 | 490 | 20 |
| 20 | 480 | 40 |
| 40 | 460 | 80 |
| 50 | 450 | 100 |

2. Preparar las muestras problemas de proteínas de acuerdo a la tabla N°5.

▪ **Tabla Anexo N°5: Preparación de muestras de proteína.**

| Diluciones | Volumen Muestra (ul) | H ₂ O destilada (volumen) (ul) | Volumen total de la solución (ul) |
|------------|--------------------------------|---|-----------------------------------|
| 1 en 25 | 8 ul de proteína | 192 ul | 200 ul |
| 1 en 50 | 100 ul de la dilución 1 en 25 | 100 ul | 200 ul |
| 1 en 100 | 100 ul de la dilución 1 en 50 | 100 ul | 200 ul |
| 1 en 200 | 100 ul de la dilución 1 en 100 | 100 ul | 200ul |

3. Colocar 20 ul de la muestra por duplicada en los pocillos de la placa.
4. Agregar el reactivo de Bradford diluido 1 en 5 con agua miliq.
5. Dejar reposar la muestra 5 minutos y llevarla a leer al lector de Elisa.
6. Usar el programa Sof Max Pro 2005, para su lectura.

Anexo 12: Protocolo de replegamiento de proteínas insolubles:

- Preparación de soluciones:

Se preparó una solución stock de 1 molar de buffer carbonato/bicarbonato de sodio a un pH 10 a 10.5. Luego se prepararon las soluciones de trabajo, las cuales fueron:

- 1.- Buffer 50 mM de carbonato/bicarbonato de sodio, 8 molar de úrea, 14 mM de 2-mercaptoetanol y 1 Mm de EDTA, a pH 10.
- 2.- Buffer 50 mM de carbonato/bicarbonato de sodio, 3.55 molar de úrea, 14 mM de 2-mercaptoetanol y 1 Mm de EDTA, a pH 10.
- 3.- Buffer 50 mM de carbonato/bicarbonato de sodio, 1 Mm de EDTA, a pH 10.

- Luego se preparó la membrana de diálisis:

Se preparó la membrana de acuerdo al protocolo (Standard grade Regenerated cellulose Dialysis Membrane Spectra/Por^a 1-5,6&7; 2013) con ciertas modificaciones.

Se lavó la membrana por 30 minutos en agua miliq. a temperatura ambiente.

Luego para remover los metales pesados que posee la membrana se usó un buffer PBS con 10 Mm de EDTA, pH 9.0, con el cual se lavó por 30 minutos.

Finalmente se lavó la membrana con agua Miliq por 30 minutos, quedando lista para su uso.

- Procedimiento del replegamiento:

Se cambió el buffer en el que se encontraba la proteína (20 Mm Tris-HCl, 8 M úrea, pH 7.8) por el buffer N° 1, usando el sistema de ultrafiltración Amicon, y concentrándolo a 5ml.

La proteína ahora en el buffer N°1, fue diluida 1:9 partes con el buffer N°2, y la dilución fue colocada en las membranas de diálisis agregando 320 ul por cada centímetro de membrana.

Una vez colocada la dilución en la membrana y ajustada con los seguros. Fue colocada en un recipiente con capacidad de 2 litros, de manera que el volumen en la membrana quede 1 a 100 con el buffer N°3, el buffer de diálisis; el preparado fue dejado por 18 horas en agitación suave, a una temperatura de 20 grados centígrados.

Anexo13: Protocolo de prueba inmunológica (Elisa):

El protocolo de la prueba de Elisa usada, fue el siguiente: siendo la prueba una Elisa indirecta.

1. Cada antígeno se diluyó en tampón carbonato-bicarbonato (C3041-Sigma).
2. Se añadió un volumen de 100 ul de antígeno correspondiente a cada pocillo en una placa de 96 pocillos (Nunc MAXISORP Thermo Fisher Scientific).
3. Las placas MAXISORP 96 pocillos se incubaron a 4 ° C durante 18 horas. Cada placa se revistió con un antígeno específico.
4. Las microplacas se lavaron con de PBS-Tween 20 al 0, 05%.
5. Un volumen de 100 ul de 1: 100; y también se probó 1 :20; antisuero se añadió 3% de leche seca no grasa, para cada microplaca recubierta específica y se incubó a 37 ° C durante 1 hora en un entorno de cámara húmeda.
6. Las microplacas se lavaron 5 veces con 200 ul de PBS-Tween 20 al 0,05%.

7. 50 ul de 1: 50'000 IgG anti-ratón conjugado HRP en leche en polvo desnatada al 5%, se añadió a cada pocillo. Todas las microplacas se incubaron a 37 ° C durante 1 hora en un entorno de cámara húmeda.
8. Las microplacas se lavaron 5 veces con 200 ul de PBS-Tween 20 al 0, 05%.
9. Un volumen de 50 ul de OPD 0, 4 mg / ml en Buffer Citrate -fosfato con perborato de sodio (Sigma P4922) se añadió a cada pocillo. Todas las reacciones se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente protegida de la Luz.
10. 50 ul de 1, 25 M de H₂SO₄ se añadió a cada pocillo para detener las reacciones.
11. Todas las reacciones detenidas se leyeron a 492 nm.

ANEXO RESULTADOS

Anexo 14: Cinética de la vacuna de albúmina de ratón con epítipo transplantado.

. kwallis absorvancia, by(tiempo)

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

| tiempo | Obs | Rank Sum |
|--------|-----|----------|
| 0 | 6 | 21.00 |
| 1 | 6 | 57.00 |
| 2 | 6 | 93.00 |
| 3 | 6 | 129.00 |

chi-squared = 21.600 with 3 d.f.
probability = 0.0001

chi-squared with ties = 21.600 with 3 d.f.
probability = 0.0001

Figura Anexo N1: Resultados Cinética de la vacuna de albúmina de ratón con epítipo transplantado

Anexo 15: Cinética de la vacuna albúmina de ratón nativa de origen comercial

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

| tiempo | Obs | Rank Sum |
|--------|-----|----------|
| 0 | 3 | 12.00 |
| 1 | 3 | 30.00 |
| 2 | 3 | 12.00 |
| 3 | 3 | 24.00 |

chi-squared = 6.231 with 3 d.f.
probability = 0.1009

chi-squared with ties = 6.253 with 3 d.f.
probability = 0.0999

Figura Anexo N2: Resultados Cinética de la vacuna albúmina de ratón nativa de origen comercial

Anexo 16: Cinética de la vacuna en base al epítipo de influenza

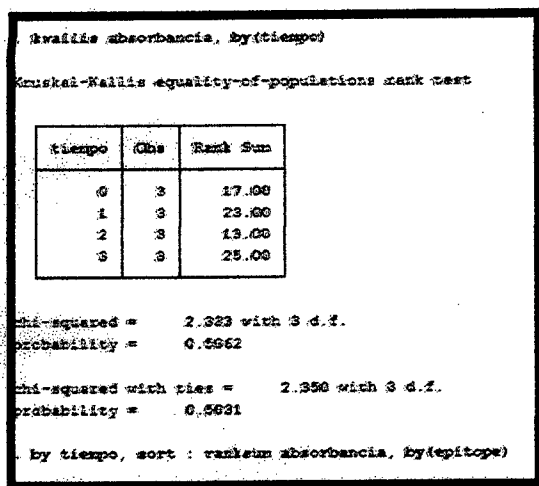


Figura Anexo N3: Resultados Cinética de la vacuna en base al epítipo de influenza

Anexo 17: Cinética de la presencia de anticuerpos reactivos contra la albúmina de ratón nativa comercial por la vacuna de albúmina de ratón con el epítipo transplantado.

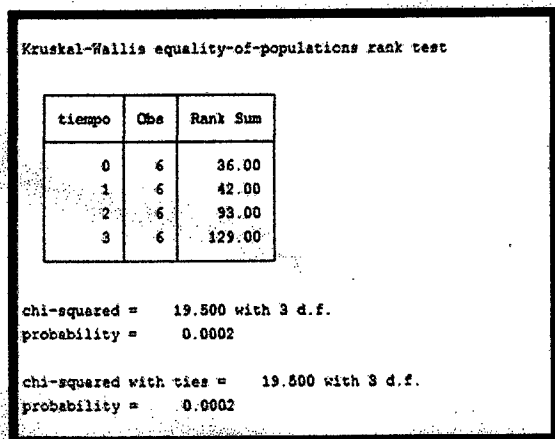


Figura Anexo N4: Resultados de Cinética de la presencia de anticuerpos reactivos contra la albúmina de ratón nativa comercial por la vacuna de albúmina de ratón con el epítipo transplantado.

Anexo 18: Cinética de presencia de anticuerpos contra el segmento His-tag de la proteína albúmina de ratón con el epítipo de influenza transplantado.

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

| tiempo | Obs | Rank Sum |
|--------|-----|----------|
| 0 | 6 | 21.00 |
| 1 | 6 | 57.00 |
| 2 | 6 | 93.00 |
| 3 | 6 | 129.00 |

chi-squared = 21.600 with 3 d.f.
probability = 0.0001

chi-squared with ties = 21.609 with 3 d.f.
probability = 0.0001

Figura Anexo N5: Resultados de Cinética de presencia de anticuerpos contra el segmento His-tag de la proteína albúmina de ratón con el epítipo de influenza transplantado.